

Écologie chimique inverse appliquée aux récepteurs olfactifs de l'insecte ravageur des cultures Spodoptera littoralis : vers des stratégies innovantes en protection des cultures

Gabriela Caballero Vidal

▶ **To cite this version:**

Gabriela Caballero Vidal. Écologie chimique inverse appliquée aux récepteurs olfactifs de l'insecte ravageur des cultures Spodoptera littoralis : vers des stratégies innovantes en protection des cultures. Sciences agricoles. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2020. Français. NNT : 2020IAVF0011 . tel-03399743

HAL Id: tel-03399743

https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-03399743

Submitted on 24 Oct 2021

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

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

NNT : 2020IAVF0011

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Gabriela Noelia CABALLERO VIDAL

Écologie chimique inverse appliquée aux récepteurs olfactifs de l'insecte ravageur des cultures *Spodoptera littoralis* : vers des stratégies innovantes en protection des cultures

Directrice de thèse : **Emmanuelle JACQUIN-JOLY**
Co-encadrement de la thèse : **Nicolas MONTAGNÉ**

Thèse présentée et soutenue à Paris le 25 mai 2020 :

Composition du jury :

Mme Sylvia ANTON, Directrice de recherche, INRAE Le Rheu	Présidente & Rapporteur
M. Claudio LAZZARI, Professeur des universités, Université de Tours	Rapporteur
M. Paul-André CALATAYUD, Chargé de recherche, IRD	Examinateur
M. Ted TURLINGS, Professeur, Université de Neuchâtel (Suisse)	Examinateur
Mme Emmanuelle JACQUIN-JOLY, Directrice de recherche, INRAE Versailles	Directrice de thèse
M. Nicolas MONTAGNÉ, Maître de conférences, Sorbonne Université	Co-encadrant de thèse

UMR 1392 Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris
INRAE Bât.1, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex

Remerciements

Cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée sans mes deux encadrants Emmanuelle Jacquin-Joly et Nicolas Montagné, qui ont été des mentors exceptionnels, humainement et professionnellement, durant ces trois années. Je tiens à remercier Emmanuelle, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa patience et gentillesse, ainsi que pour ses précieux conseils, l'aide de toute sorte et la motivation qu'elle m'a transmise tout au long de ces années de thèse. Je tiens également à remercier Nicolas Montagné, mon co-encadrant de thèse, pour son esprit positif même dans des moments compliqués, son aide permanente, ses nombreux conseils et sa bonne humeur. J'adresse mes plus vifs remerciements à ces deux merveilleux chercheurs qui m'ont appris la persévérance et à reprendre le chemin malgré les difficultés, merci pour leur soutien et leur disponibilité, vous m'avez aidée à grandir scientifiquement et j'espère avoir la chance de travailler encore avec vous à l'avenir.

Je voudrais remercier Sylvia Anton et Claudio Lazzari d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que Ted Turlings et Paul-André Calatayud d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et d'évaluer également mon travail. Je tiens à remercier également les membres de mes comités de thèse Laure Kaiser-Arnauld et Christophe Héligon pour leurs précieux conseils. J'aimerais remercier Fréderic Marion-Poll, professeur à AgroParisTech qui m'a présenté Emmanuelle lors de mes cours d'écologie chimique.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de Becal, l'organisme boursier qui a financé mon projet de thèse et mes recherches, merci au gouvernement du Paraguay pour avoir accepté de financer mes études en France. Ce travail a été effectué dans le cadre du projet DEMETER n° ANR-16-CE21-0002, je remercie donc également l'Agence Nationale de Recherche pour le soutien financier aux travaux.
Je souhaite remercier tout le département ECOSENS de Versailles et Paris pour les bons moments que j'ai partagés avec vous lors des repas de Noël, les pique-niques, les journées d'animation... je garde de très beaux souvenirs de tous ces moments ensemble.
J'aimerais remercier plus particulièrement ceux avec qui j'ai partagé le quotidien au laboratoire, notamment Fotini qui a été adorable et toujours ouverte pour partager ses expériences avec moi, Camille pour la patience et son aide précieuse en bioinformatique, ainsi que Marie et Christelle qui étaient toujours disponibles pour m'aider et me conseiller dans les différentes manips.
J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont participé directement à ce travail de thèse. Je tiens à remercier le Chemosimlab de Nice, notamment Jérôme Golebiowski, Sébastien Fiorucci et Cédric Bouysset pour leur contribution de chimieinformatique. Je voudrais remercier également Daniel Boujard, Christophe Héligon et Guillaume Audic qui ont fait de leur mieux pour faire avancer la partie de déorphanisation en xénope au CRB de Rennes et pour m'avoir accueillie auprès d'eux pendant deux séjours. Merci également à Guirong Wang et son équipe à l'Institut de Protection des Plantes de la CAAS de Pékin, en Chine, pour m'avoir accueillie pendant deux mois et m'avoir formée au TEVC manuel.
Je voudrais remercier Jérémy Gévar pour l'aide avec le setup de comportement des chenilles, ainsi que Centina pour m'avoir fourni gentiment de nombreuses molécules de son odorothèque.
Je voudrais remercier les membres de l'équipe Neo, particulièrement Philippe Lucas et Michel Renou avec qui j'ai eu l'occasion de partager des discussions scientifiques intéressantes, et Matthieu Dacher pour l'aide avec les analyses statistiques du comportement. Je remercie également nos animaliers de Versailles et plus spécialement Pascal qui élève nos *Spodoptera* et Philippe T qui prépare les tubes d'élevage de *Drosophile*.

Je souhaite remercier l'équipe de Paris qui m'a accueillie ainsi que mes stagiaires de la meilleure façon pendant la durée de nos expériences. Je remercie Martine Maïbèche et David Siaussat de m'avoir ouvert les portes du laboratoire à Jussieu. Je remercie énormément Françoise qui avec beaucoup de gentillesse et patience m'a guidée avec les manips de biologie moléculaire. Merci Annick pour les élevages des chenilles à Paris, l'aide aux stagiaires et ta bienveillance. Je remercie Thomas Ch pour son aide avec les analyses d'expression différentielle et sa bonne humeur.

J'aimerais ensuite remercier tous mes camarades en thèse, particulièrement ma co-thésarde Lucie avec qui j'ai partagé l'expérience de la thèse, les congrès et différents séjours, nous avons eu de nombreux moments de fou rire, des rigolades mais aussi de travail dur, c'était un plaisir pour moi et je garde les meilleurs souvenirs de cette personne super énergique et persévérante. Je remercie les autres thésard(es) de Paris Aude, Thomas, Laëtitia, Thibaut avec qui j'ai eu l'occasion de partager des bons moments à mon passage à Jussieu. Ainsi que Tomas B à Versailles et les anciens thésards Claudia et Arthur avec qui j'ai pu partager des discussions intéressantes.
Je remercie énormément Hayat, Céline et Julie, trois étudiantes très motivées que j'ai eu l'occasion de co-encadrer et qui ont contribué à ce projet.
Cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle a été sans toutes les personnes que j'ai rencontrées, je voudrais remercier Elodie, Camille H, Lucie C, Santosh, Alessandro, Angel, Adrienne, Joanne, Emma, Rémi et ceux que j'oublie, pour les moments partagés pendant les pauses café et des moments de détentes autour d'un verre !
Un grand merci à Nicolas Boite qui est venu à mon aide pour toutes les démarches administratives concernant ma bourse et mes déplacements. Je remercie également Yaména pour la gestion de documents.
Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui m'ont accompagnée et soutenue de près comme de loin tout au long de ces années de thèse :
Agradezco infinitamente a mis padres César y Zulma, que son la fuente de mi inspiración, gracias papá y mamá por apoyarme siempre. Este doctorado va dedicado a ustedes, gracias por creer en mí y por transmitirme la fuerza y confianza para llegar a la meta. Agradezco también a mis hermanos Guille, Lari y Pin así como a toda mi familia que siempre estuvo pendiente de mí y desde Paraguay me enviaron los mejores deseos.
Gracias a esas personas maravillosas que tengo como amigos, que a pesar de la distancia están siempre presentes apoyando mis proyectos, gracias Mayra, Patty, Belén, Clari, Maji, Yeyo, Diego, Julito, Pazi y Lu.
Gracias a los paraguayos de Paris: Ali, Eli, Rim, Caro, Johnny, Kaori y Majo que vivieron de cerca conmigo esta experiencia. Así como otros amigos en diferentes rincones del mundo que manifestaron su presencia y apoyo: Ana, Inte, Stefanie, Heidi, Rocio, Julia, Oli, Ed e Yvonne.
Agradecimientos especiales a Eusebia, Juan y Ernesto Paredes, paraguayos que viven en Burdeos y que tuve el placer de conocer durante estos años. Gracias por el aliento constante y por la fuerza que me han transmitido para continuar con entusiasmo mi trabajo.

Merci à toute la famille Chesnais pour leur soutien, leurs encouragements et l'attention qu'ils me portent.
Enfin une telle expérience n'aurait pas été possible sans le soutien et la bienveillance de Quentin, qui a été avec moi dès le début de cette aventure, et que je pense mérite une deuxième thèse tellement il m'a aidé avec la mienne. Merci pour tes encouragements, ton soutien quotidien réconfortant, ta patience, pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables. Il est difficile de résumer en quelques mots tout ce que tu m'apportes, je te remercie énormément et je suis sûre qu'ensemble nous allons découvrir de nouveaux horizons et vivre des belles aventures !

Sommaire

Remerciements **3**

Liste des abréviations **9**

Liste des figures **11**

Liste des tableaux **12**

INTRODUCTION GENERALE **13**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **16**

PARTIE I : Molécules odorantes et olfaction **16**

1 Les molécules odorantes **16**

2 Nature chimique des volatils **16**

2.1 Volatils émis par les plantes **16**

2.1.1 Terpènes 17

2.1.2 "Green leaf volatiles" 17

2.1.3 Composés aromatiques 18

2.1.4 Composés contenant de l'azote et du soufre 19

2.2 Volatils émis par les insectes **19**

2.2.1 Les phéromones 19

2.2.2 Les hydrocarbures cuticulaires (CHC) 20

2.2.3 Autres volatils d'insectes 21

3 Odorants et odeurs **21**

3.1 L'environnement odorant des insectes **22**

3.1.1 Distribution d'un panache d'odeur 22

PARTIE II : Le système olfactif chez l'insecte **24**

1 Morphologie et anatomie des organes olfactifs périphériques : antennes, sensilles et neurones sensoriels olfactifs **24**

1.1 Sensilles olfactives : l'exemple de la drosophile **25**

1.1.1 Les sensilles trichoïdes 26

1.1.2 Les sensilles basiconiques 26

1.1.3 Les sensilles coeloconiques 27

1.2 Types de sensilles chez les Lépidoptères **28**

1.2.1 Les sensilles auricillica 28

1.2.2 Les sensilles chaetiques 28

1.2.3 Les sensilles styloconiques 28

1.2.4 Les sensilles squamiformia 29

1.3 Comparaison des organes olfactifs périphériques des papillons et des chenilles ... **29**

1.4 L'équipement chimiosensoriel des chenilles 30

2 Anatomie du système olfactif central 31

2.1 Centre olfactif primaire 31
2.1.1 Le lobe antennaire 31
2.1.2 Les neurones de projection (PN) 32
2.1.3 Les neurones locaux (LN) 32

2.2 Centres olfactifs secondaires 32
2.2.1 Les corps pédonculés 32
2.2.2 Les cornes latérales 33

2.3 Mécanismes périphériques : description des acteurs moléculaires 34
2.3.1 Protéines olfactives solubles 34
2.3.2 Les récepteurs membranaires 36
2.3.2.1 Les récepteurs olfactifs (OR) 37
2.3.2.1.1 Histoire de leur découverte 37
2.3.2.1.2 Le rôle du corécepteur Orco 38
2.3.2.1.3 Caractéristiques fonctionnelles des OR 39
2.3.2.2 Les récepteurs ionotropiques (IR) 40
2.3.2.3 Les récepteurs gustatifs (GR) 42
2.3.2.4 Sensory neuron membrane protein (SNMP) 43

2.4 Origine et évolution des OR 44

2.5 Le codage olfactif 46

PARTIE III : Méthodes d'étude des OR d'insectes 49

1 Méthodes d'identification 49

1.1 Approches génomiques et transcriptomiques 49
1.1.1 Les méthodes de séquençage 49
1.1.1.1 Méthode Sanger 51
1.1.1.2 Roche / 454 51
1.1.1.3 Illumina/Solexa sequencing 51

1.2 Bioinformatique, identification et quantification des gènes chimiosensoriels dans un transcriptome 53
1.2.1 Outils de nettoyage pré-assemblage 53
1.2.2 Outils d'assemblage d'un transcriptome 54
1.2.3 Validation de la qualité du transcriptome généré 55
1.2.4 Annotation de gènes 57
1.2.5 Analyse d'expression différentielle 57

2 Analyse fonctionnelle : comment identifie-t-on les ligands des OR ? 58

***2.1* Méthodes *in vivo* 59**
2.1.1 Système d'expression en neurone vide 59

2.1.2 Système «Knock-in *Or67d*^{GAL4} » pour expression des PRs 59
2.1.3 Nouveau système de neurone vide 60

2.2 Méthodes i*n vitro* 61
2.2.1 Lignées cellulaires 61
2.2.2 Expression en ovocytes de xénope 62

2.3 Autres méthodes : interférence ARN et édition des gènes 64
2.3.1 L'ARN interférence 65
2.3.2 Les nucléases à doigts de zinc 65
2.3.3 Les TALEN 66
2.3.4 Le système CRISPR/Cas9 66

PARTIE IV : Structure et modélisation 68

1 Structure 3D des OR d'insectes 68

2 Prédiction in silico de ligands : méthodologie 69

3 Application de la chimio-informatique aux OR d'insectes 70

PARTIE V : Le modèle d'étude *Spodoptera littoralis* 72

1 Origine et aire de répartition 72

2 Cycle de vie et biologie 72

3 Impact agronomique du genre *Spodoptera* 74

***4* Méthodes de lutte contre *S. littoralis* 74**

5 Organes olfactifs périphériques et centraux chez *Spodoptera littoralis* 75

5.1 Organes olfactifs périphériques des adultes et des chenilles 75

5.2 Lobe antennaire et glomérules 77

6 Les odeurs clés dans l'écologie de *S. littoralis* : phéromones et odeurs de plantes. 78

6.1 Les phéromones 78

6.2 Les odeurs de plantes 79

7 Gènes chimiosensoriels chez *S. littoralis* 80

8 Que connaît-on de la fonction des OR de *S. littoralis* ? 81

8.1 Récepteurs phéromonaux 81

8.2 Récepteurs non phéromonaux 82

PARTIE VI : Problématiques, objectives, hypothèses, stratégie du projet de thèse 84

Objectifs détaillés de la thèse : 85

Chapitre I : L'analyse transcriptomique du chimiosensome des larves d'une noctuelle polyphage révèle des récepteurs olfactifs potentiellement spécifiques des larves qui sont activés par des composés aromatiques et des terpènes. 88

Chapitre 2 : Identification de nouveaux ligands écologiquement pertinents pour les récepteurs olfactifs d'un papillon de nuit en utilisant la séparation par chromatographie en phase gazeuse d'extraits d'odeurs de plantes couplée à l'électrophysiologie..... 126

Chapitre 3 : Identification de nouveaux agonistes d'un récepteur olfactif chez une noctuelle ravageuse de cultures en utilisant la chimio-informatique 145

Chapitre 4 : Écologie chimique inverse chez un papillon de nuit : l'approche de machine learning appliquée aux récepteurs olfactifs permet l'identification de nouveaux agonistes actifs sur le comportement. 157

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES: 179

CONCLUSION GENERALE 202

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 203

ANNEXES 233

Article 1: Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to *Spodoptera littoralis* Larval Odorant Receptors. 233

Article 2: A novel subfamily of putative moth pheromone receptors revealed by functional characterization in *Spodoptera littoralis*. 242

Communication scientifique: Insect Chemical Ecology 2018 PhD course report..... 260

Liste des abréviations

ab1 : sensille basiconique de type 1, « antennal basiconic 1 » en anglais
ab3 : sensille basiconique de type 3, « antennal basiconic 3 » en anglais
ac1, ac2, ac3, ac4 : sensille coeloconique de type 1, 2, 3, 4, « antennal coeloconic » en anglais
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AL : lobe antennaire ou « Antennal lobe » en anglais
aLRT : Approximate Likelihood-Ratio Test
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messagers
B1, B2, B3 : grandes sensilles basiconiques chez les larves de lepidoptères
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CHC : hydrocarbures cuticulaires
COV : composés organiques volatils
CRB : Centre de ressources xénope
CRISPR : courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées ou « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » en anglais
Cryo-EM : Cryo-microscopie électronique
CSP : Chemosensory proteins
cVA : 11-cis-vaccényl-acétate
ddNTP : didésoxyribonucléotides
DEET : N,N-Diethyl-3-methylbenzamide
DMAPP : diméthylallyl diphosphate
DMNT : 4,8-dimethyl-1,3(E),7-nonatriene
EFSA: Scientific Opinion on the pest categorisation of *Spodoptera littoralis*
EPPO : European Plant Protection Organisation
EST : Expressed Sequences Tag
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
FPP : diphosphate de farnésyle
GC : chromatographie en phase gazeuse
GGPP : diphosphate de géranylgéranyle
GLV : substances volatiles de feuilles vertes ou « Green leaf volatiles » en anglais
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G
GPP : diphosphate de géranyle
GR : récepteurs gustatifs
GST : glutathione S-transferases
HDR : réparation par homologie dirigée
HEK293 : cellules rénales embryonnaires humaines ou « Human embryonic kidney cells » en anglais
HIPV : Herbivore-induced plant volatiles
HPL : hydroperoxyde lyase

iGluR : récepteurs ionotropiques au glutamate
IPP : diphosphate d'isopenténylе
IR : récepteurs ionotropiques
LBVS : ligand-based virtual screening
LH : cornes laterales ou « lateral horns » en anglais
LHN : neurones de la corne latérale ou « Lateral horn neurons » en anglais
LN : neurones locaux ou « local neurons » en anglais
LOX : lipoxygénases
NGS : Next Generation Sequencing
NHEJ : jonction d'extrémités non homologues sujette à erreur
OBP : Odorant-Binding Proteins
ODE : enzyme de dégradation des odorants ou « Odorant-Degrading Enzymes » en anglais
OR : récepteur olfactif
Orco : corécepteur
OSN : neurones sensoriels olfactifs
PCR : Polymerase Chain Reaction
Phéromone BP : « Brood Pheromone »
PN : neurones de projections ou « Projection neurones » en anglais
PR : récepteurs phéromonaux
qPCR : quantitative- Polymerase Chain Reaction
QSAR : relations structure-activité quantitatives ou « Quantitative Structure-Activity Relationships » en anglais
RNAi : interférence d'ARN
RNAseq : séquençage de l'ARN, « RNA sequencing » en anglais
RSEM : RNA- Seq by Expectation Maximization
RT-PCR : Real time - Polymerase Chain Reaction
SBVS : structure-based virtual screening
sf9 : cellules provenant du tissu ovarien du papillon de nuit *Spodoptera frugiperda*
SGS : Second Generation Sequencing
SNMP : « Sensory neuron membrane protein » en anglais
SSR : enregistrement monosensillaire ou « single sensillum recording » en anglais
T1 : sensille trichoïde de type 1
TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TEVC: technique d'électrophysiologie à deux électrodes en courant clampé ou « Two electrode voltage clamp » en anglais
TGS : Third Generation Sequencing
UniProt : Universal protein Resource
VS : « virtual screening » en anglais
ZFN : nucléases à doigts de zinc ou « Zinc-finger nucleases »
ZFP : protéines à doigts de zinc

Liste des figures

Figure 1. Principales classes de volatils de plantes
Figure 2. Illustration du comportement de convergence vers le signal d'un papillon mâle, vers le panache de phéromone de la femelle
Figure 3. Différents types d'antennes d'insectes
Figure 4. A : Photo du papillon de nuit *S. littoralis*. B : Photo de microscopie électronique à balayage d'une antenne de mâle du papillon *S. littoralis*. C : Schéma d'une sensille olfactive
Figure 5. Distribution des différents types des sensilles sur l'antenne de *D. melanogaster*
Figure 6. Réponses électriques typiques de 2 types de sensilles basiconiques, mesurées en enregistrement électrophysiologique monosensillaire (SSR)
Figure 7. Dessin de la morphologie de l'antenne de larve de Lépidoptères
Figure 8. Palpes maxillaires d'une larve de *Yponomeuta cagnagellus*.
Figure 9. Représentation schématique de l'organisation du système olfactif chez la drosophile
Figure 10. Processus de détection d'odeurs au niveau périphérique
Figure 11. Topologie membranaire des OR de mammifères et des OR d'insectes
Figure 12. A : Schéma d'une antenne de drosophile mettant en évidence les structures contenant des IR. B : Structure transmembranaire d'un IR
Figure 13. Morphologie d'une sensille gustative chez l'insecte.
Figure 14. Intervention des SNMP dans le processus de détection/ d'épuration des molécules
Figure 15. Évolution des familles des gènes chimiosensoriels chez les Arthropodes
Figure 16. Le modèle d'évolution par « naissance et mort » de gènes de récepteurs olfactifs
Figure 17. Le codage combinatoire
Figure 18. Les étapes d'acquisition des données RNA-seq.
Figure 19. Méthode de séquençage Sanger
Figure 20. Technologies de séquençage de deuxième et troisième génération.
Figure 21. Assemblage de transcriptome de novo et workflow d'analyse.
Figure 22. Vue d'ensemble de Trinity
Figure 23. Différents systèmes d'expression pour la caractérisation fonctionnelle d'OR
Figure 24. Système d'expression en « neurone vide » chez la drosophile.
Figure 25. Knock-in par CRISPR/Cas9 pour le nouveau système de neurone vide
Figure 26. Système d'expression hétérologue en ovocytes de xénope couplé au TEVC.
Figure 27. Retouche génomique par le système CRISPR-Cas9
Figure 28. Architecture de l'homotétramère d'Orco.
Figure 29. Workflow pour le criblage d'une banque de substances chimiques à l'aide d'un filtrage empirique et basée sur une QSAR
Figure 30. Aire de répartition de *Spodoptera littoralis*
Figure 31. Cycle de vie de *Spodoptera littoralis*
Figure 32. Système de piégeage par phéromone sexuelle.
Figure 33. Différents types de sensilles chez *Spodoptera littoralis*
Figure 34. Le complexe macroglomérulaire (MGC) chez les mâles de *S. littoralis*

Figure 35. Composants de la phéromone sexuelle de S. littoralis
Figure 36. Distribution des gènes chimiosensoriels chez les adultes et les larves de *S. littoralis*
Figure 37. Expression en qPCR de SlitR5 et position dans le clade des récepteurs phéromonaux
Figure 38. Évolution fonctionnelle des OR de lépidoptères
Figure 39. Résultats positifs obtenus en utilisant le Hiclamp TEVC lors de la preuve de concept
Figure 40. Ovocytes de xénopes après 24h du traitement de défolliculariſation avec collagénase.
Figure 41. Profils des réponses atypiques pour des SlitOR exprimés en ovocytes de xénope
Figure 42. Réponses SSR d'OSN ab3A de drosophile exprimant SlitOR31, à différents ligands potentiels prédits par la modélisation
Figure 43. Position phylogénétique des SlitOR dans le clade des OR répondant aux aromatiques.

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des travaux qui ont utilisé l'expression en ovocytes de xénope couplée au « two-electrode voltage clamp » pour la déorphanisation d'OR d'insectes

INTRODUCTION GENERALE

Les animaux dépendent de leurs sens pour détecter les informations provenant de leur environnement, ces informations étant ensuite traitées pour générer une réponse adaptée. En fonction des animaux et de leur écologie, certains sens sont plus ou moins développés. Les oiseaux, par exemple, ont un sens de la vue très développé avec des photorécepteurs spécialisés et sensibles à la lumière ultraviolette, ce qui a un impact sur leurs comportements notamment dans la recherche de nourriture et la signalisation pendant le vol (Cuthill et al. 2000). D'autres animaux comme les chauves-souris possèdent une sensibilité auditive remarquable par rapport aux autres mammifères, avec des organes morphologiquement adaptés qui leurs confèrent une audition à haute fréquence (Davies et al. 2013). Dans les milieux aquatiques, certains animaux comme les poulpes possèdent des récepteurs qui associent trois sens : le toucher, l'odorat et le goût (Wells 1963, Graziadei and Gagne 1976), ce qui leur permet à la fois de localiser et d'évaluer la qualité de leurs proies. Les insectes se servent principalement de leurs sens chimiques (la gustation et l'olfaction) pour percevoir leur environnement. La gustation permet une évaluation par contact de la qualité de la source et le rejet ou l'acceptation finale de la nourriture ou de l'hôte. L'olfaction implique la détection des composées volatils à longue et courte distances. Par exemple, chez les papillons de nuit, le sens de l'odorat est très développé, ainsi les mâles sont capables de détecter la phéromone sexuelle émise pas les femelles à des centaines de mètres (Hansson 2002).

Dans le monde, il existerait environ 5,5 millions d'espèces d'insectes dont seulement 20%, soit ~1 million d'espèces, ont pour le moment été décrites, ce qui représente la moitié des espèces animales et végétales décrites jusqu'à présent (Stork 2017). Les insectes sont d'une extraordinaire diversité et leur présence sur la terre est fondamentale. Ils constituent le groupe d'organismes multicellulaires le plus diversifié et contribuent de manière significative aux fonctions écologiques telles que la pollinisation, la décomposition de la matière organique ou le recyclage du carbone (Losey and Vaughan 2006, Bradley et al. 2009).

Cependant, certaines espèces d'insectes sont aussi vecteurs de maladies pour les animaux dont l'homme, comme les moustiques, classés comme les principaux vecteurs de maladies dans le monde (WHO 2020), mais également les glossines, responsables de la maladie du sommeil, ou encore les triatomes responsables de la maladie de Chagas. Il existe également des insectes vecteurs des maladies chez les plantes comme le puceron *Myzus persicae*, vecteur de plus de 100 virus différents (Blackman and Eastop 2000), ou le psylle des agrumes *Diaphorina citri*, vecteur d'une bactérie qui menace les cultures d'agrumes (pertes estimées à des milliards de dollars aux États-Unis) (Gottwald 2010, Spreen et al. 2014). Beaucoup d'insectes sont également d'importants ravageurs des forêts, des cultures (*e.g.* lépidoptères défoliateurs des plantes) et des denrées stockées (Hagstrum and Phillips 2017). L'impact de ces insectes dits « nuisibles » représente un problème majeur dans la société, car ils affectent la production de nourriture avec des pertes importantes estimées à des centaines de milliards de dollars par an (Kogan and Prokopy 2009).

Des stratégies de lutte contre les insectes ravageurs ont été mises en place, dont la lutte dite « chimique » (c'est-à-dire, l'utilisation d'insecticides de synthèse) qui reste la plus répandue. L'utilisation de ce type de produits entraîne cependant des effets secondaires indésirables sur

l'environnement (effets non ciblés) à différents niveaux (des individus aux écosystèmes) (Köhler and Triebskorn 2013). D'autres méthodes moins nocives ont déjà été mises en place avec succès, dans le cadre du développement du biocontrôle. Le biocontrôle des insectes ravageurs regroupe quatre grandes approches : l'utilisation de macro-organismes (comme des insectes parasitoïdes), de microorganismes (bactéries entomopathogènes par exemple), de substances d'origine naturelle et de médiateurs chimiques. Parmi cette dernière approche, on trouve notamment des stratégies ciblant l'olfaction des insectes, comme les pièges à phéromones utilisés pour capturer les mâles de certains lépidoptères et donc limiter la reproduction (Barclay and Van Den Driessche 1983, Witzgall et al. 2010) ou la confusion sexuelle qui utilise également des phéromones de synthèse diffusées dans l'environnement et qui perturbe la détection des femelles par les mâles. Un autre système, dit de répulsion-attraction (ou « push-pull » en anglais), consiste à semer entre les plantes cultivées des espèces repoussant les insectes nuisibles grâce à leur bouquet de composés volatils, tout en semant à la périphérie du champ des espèces émettant des molécules odorantes attractives pour ces insectes (Miller and Cowles 1990, Pickett et al. 2014). Ces méthodes sont très ciblées, contrairement à beaucoup d'insecticides de synthèse, et ne nuisent pas aux ennemis naturels par exemple, ni aux pollinisateurs, et préservent la biodiversité en général. A long terme, ces méthodes permettent une réduction significative des populations (Witzgall et al. 2010). Cependant, elles sont orientées vers le contrôle des populations en visant essentiellement les adultes. Elles ne contrôlent donc pas l'incidence des insectes dans leur intégralité car les dommages sont souvent causés par les stades juvéniles. En effet chez les lépidoptères, le stade ravageur est le stade chenille, les adultes étant le stade de dispersion et de reproduction.

C'est dans le cadre du biocontrôle des insectes ravageurs par médiateurs chimiques, et en se focalisant sur l'aspect de la détection des molécules odorantes, que se positionne mon travail de thèse. Je me suis particulièrement intéressée à mieux comprendre les bases moléculaires de l'olfaction chez les lépidoptères au stade larvaire - stade de développement responsable des dégâts aux cultures. La plupart des études menées sur l'olfaction des lépidoptères ont été conduites chez les adultes, une des considérations étant que les chenilles n'auraient pas à choisir leur plante hôte, selon le principe de « mother knows best » (c'est la femelle qui choisit le site de ponte le plus adapté à sa descendance) (Mayhew 1997). Il apparaît cependant de plus en plus clairement que les chenilles ont un sens de l'odorat développé et qu'elles le mobilisent lors de la recherche de nourriture. Mieux comprendre les mécanismes olfactifs chez les chenilles apportera des informations nouvelles sur la neurobiologie des insectes mais ouvre également la voie à la mise au point de méthodes de biocontrôle ciblant ce stade ravageur.

Ainsi, mon travail s'est centré sur l'étude de l'olfaction chez les chenilles d'une noctuelle ravageuse des cultures, *Spodoptera littoralis.* J'ai d'abord séquencé et assemblé un transcriptome des organes chimiosensoriels des chenilles pour identifier les gènes chimiosensoriels exprimés à ce stade, puis caractérisé la fonction de certains récepteurs olfactifs, impliqués dans la détection des odorants, et enfin vérifié le comportement associé après intégration des informations. Concrètement, j'ai utilisé une approche multidisciplinaire alliant la bioinformatique (transcriptomique et annotation de gènes), la chimie-informatique (prédiction de potentiels ligands *in silico,* en collaboration), la biologie moléculaire (expression hétérologue de récepteurs olfactifs chez la Drosophile et en ovocyte de xénope), l'électrophysiologie (*in vitro* et *in vivo*) et enfin l'éthologie (mise au point d'une approche comportementale adaptée pour les chenilles).

Les résultats obtenus sont des avancées importantes pour concrétiser l'objectif à long terme de cette étude, consistant en l'identification de récepteurs olfactifs de chenilles importants dans les comportements alimentaires dont l'étude pourrait accélérer la découverte de nouveaux médiateurs chimiques agissant sur le comportement des chenilles, et ainsi proposer à terme de nouveaux moyens de biocontrôle de ce stade.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I : Molécules odorantes et olfaction

1 Les molécules odorantes

L'olfaction est la capacité à détecter différents types de molécules volatiles. Chez les insectes, l'olfaction est essentielle pour déterminer un comportement particulier, comme l'attraction ou la répulsion envers une source de nourriture ou un partenaire sexuel, fuir un danger et faire face avec succès à certaines situations.

Une terminologie a été développée pour les composés chimiques qui fonctionnent comme des signaux entre organismes. Ces composés sont regroupés sous l'appellation générale de composés sémiochimiques (Hare and Weseloh 2009) ou médiateurs chimiques. Au sein de cette catégorie, on trouve les substances allélochimiques et les phéromones.

Les substances allélochimiques sont des molécules permettant la communication entre des espèces différentes. Il peut s'agit de métabolites émis par les plantes (Thompson and Simpson 2009) les micro-organismes ou les animaux. Les composés allélochimiques sont divisés en deux sous-catégories, selon que l'organisme émetteur ou récepteur est avantagé ou désavantagé par le signal. Si les espèces qui produisent le composé en bénéficient et que le destinataire est affecté négativement, le produit chimique est nommé allomone. Un exemple est l'hémiptère *Pachycoris stallii* qui produit des substances répulsives pour éloigner les prédateurs, qui sont principalement des vertébrés (Williams et al. 2001). Quand une substance est bénéfique à l'espèce receveuse, elle est appelée kairomone. Les produits chimiques produits par les insectes hôtes qui servent de signaux aux parasitoïdes sont des kairomones car le parasitoïde les exploite au détriment de l'insecte hôte (Hare and Weseloh 2009). Certaines substances peuvent être bénéfiques aux espèces émettrices et réceptrices. Ce sont des synomones, comme dans le cas de l'abeille qui récupère le nectar des fleurs qu'elle pollinise en même temps.

Le deuxième groupe dans la classification des substances sémiochimiques correspond aux phéromones. Ces substances sont des messages chimiques qui induisent une réaction comportementale ou une modification physiologique chez les individus de la même espèce. Les types de réponses comportementales évoquées par les phéromones chez les insectes sont extrêmement variés et incluent des comportements d'alarme, de défense, d'agrégation, d'attraction, de reconnaissance des parents et des colonies, de marquage de sites de ponte, de comportement d'accouplement, de recrutement, de suivi des traces et même de thermorégulation (Cardé and Millar 2009).

2 Nature chimique des volatils

2.1 Volatils émis par les plantes

Les composés organiques volatils (COV) émis par les plantes peuvent fournir des signaux complexes et hautement spécifiques susceptibles de propager des informations entre plantes ou d'informer d'autres organismes de la qualité de l'hôte (Kessler and Morrel 2010). Ces COV sont de

nature chimique très variée (Lichtenthaler and Zeidler 2002). Il peut s'agir d'alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes, éthers, esters, acides carboxyliques et divers types de terpènes, de composés aromatiques, de composés contenant de l'azote et d'autres dérivés d'acides gras comme des constituants mineurs (Loreto et al. 2008, Dudareva et al. 2009, Lichtenthaler 2010) (Figure 1).

Les substances volatiles des plantes sont en grande partie des produits lipophiles de masse moléculaire inférieure à 300 Da (Dudareva et al. 2009). Voici une brève description de ces composés :

2.1.1 Terpènes

Les terpènes, en tant que plus grande classe de métabolites secondaires de plantes, ont de nombreux représentants volatils. Il existe différentes classes de terpènes, selon le nombre d'unités isopréniques : hemiterpenes (C5, *e.g.* isoprene), monoterpenes (C10, *e.g.* geraniol, linalool, menthol, 1,4-cineol), sesquiterpenes (C15, *e.g.* farnesol, bisabolol, nerolidol) et diterpenes (C20, *e.g.* phytol, camphorene, taxol, ginkgolides) qui présentent des pressions de vapeur suffisantes dans des conditions atmosphériques normales pour permettre un rejet important dans l'air (Dudareva et al. 2009, Lichtenthaler 2010).

La biosynthèse des terpénoïdes suit la "règle biogénétique de l'isoprène". Dans un premier temps, l'unité C5 isoprénique active doit être synthétisée pour donner le diphosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Les deux unités C5 sont en équilibre grâce à l'action de l'isomérase IPP. Le DMAPP est ensuite transformé en diphosphates de prényle plus longs tels que le diphosphate de géranyle (GPP), le diphosphate de farnésyle (FPP) et le diphosphate de géranylgéranyle (GGPP) par un allongement consécutif avec l'IPP. Ensuite, le squelette C de base de ces diphosphates de prényle peut subir diverses isomérisations, cyclisations et réactions redox pour finalement donner la grande variété des composées isoprénoïdes et terpénoïdes différents que l'on trouve dans nombreuses familles de plantes (Lichtenthaler and Zeidler 2002).

2.1.2 "Green leaf volatiles"

Les « substances volatiles de feuilles vertes » (ou GLV pour « Green leaf volatiles ») sont des aldéhydes, des alcools ou des esters à 6 carbones, ainsi nommés pour l'odeur distinctive qui se dégage lorsque les feuilles sont broyées ou blessées, après avoir subi des stress biotiques ou abiotiques. L'odeur de ces composés est perçue par l'homme de la même manière que les herbes coupées et ils jouent un rôle important dans les défenses des plantes (Hatanaka 1993, Matsui 2006, Scala et al. 2013).

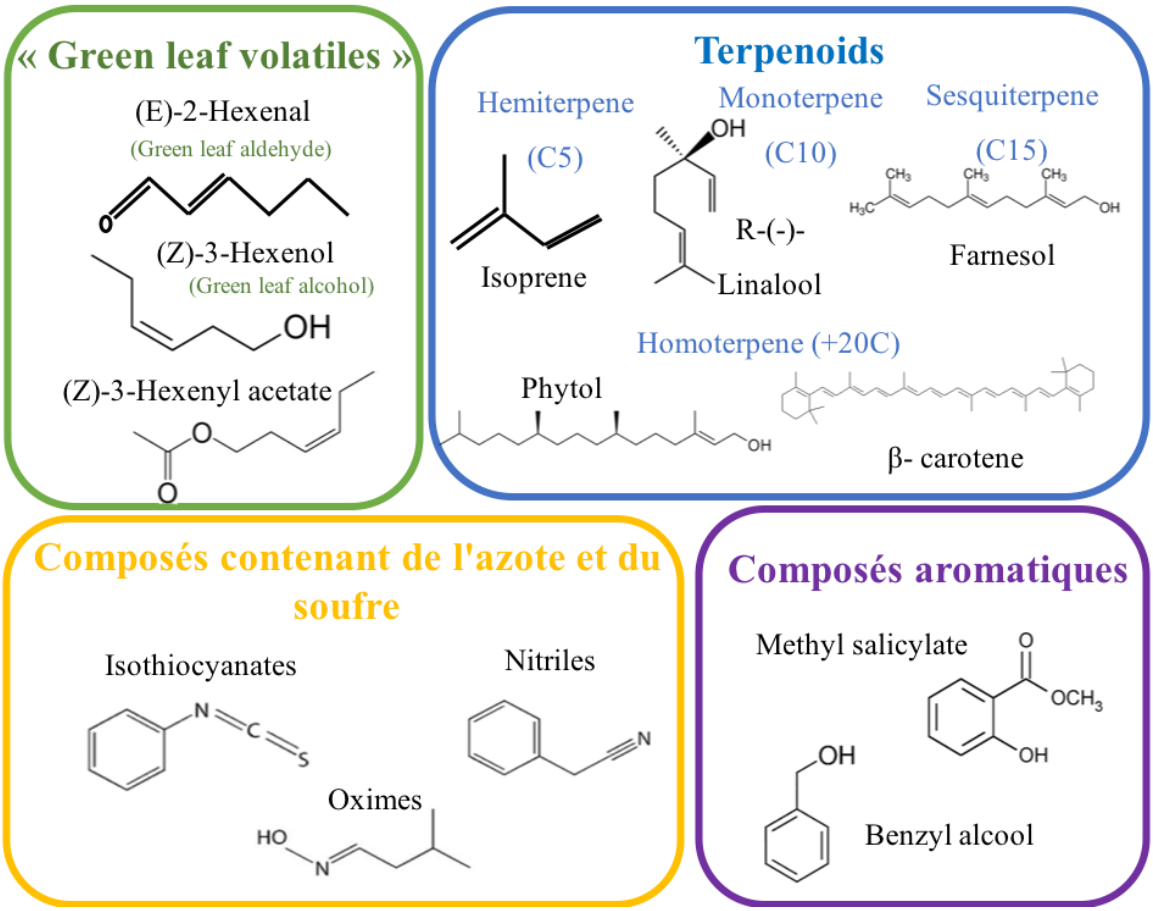


Figure 1. Principales classes de volatils de plantes (adapté de Clavijo Mccormick et al. (2014))

Les GLV sont des molécules importantes pour la signalisation au sein des plantes et avec d'autres organismes pour se reconnaître entre eux et/ou pour se faire concurrence (Matsui, 2006). Ces composés sont formés à partir d'acides gras par une réaction de dioxygénation catalysée par des lipoxygénases (LOX) pour donner de l'hydroperoxyde d'acide gras, puis une réaction de réarrangement pour cliver les hydroperoxydes d'acides gras par l'hydroperoxyde lyase (HPL) pour former des aldéhydes en C6 et des oxoacides à 12 atomes de carbone (Matsui and Koeduka 2016).

Depuis la confirmation des GLV en tant que constituants des feuilles vertes, de nombreuses études se sont intéressées à leurs fonctions physiologiques. Chez certaines espèces d'insectes par exemple, des GLV ont un effet essentiel pour l'accouplement (Riddiford 1967) et pour la détection des molécules attractives (allomone, kairomone, phéromone) (Kessler and Baldwin 2001, Scala et al. 2013).

2.1.3 Composés aromatiques

Ils comprennent toute une classe de composés chimiques insaturés caractérisés par un ou plusieurs cycles d'atomes de carbone reliés par des liaisons covalentes de deux types différents. Le benzène est considéré comme un composé modèle des composés aromatiques, il est formé d'un cycle de 6 atomes de carbone et de six atomes d'hydrogène. Quelques exemples d'autres molécules

appartenant à ce groupe sont l'eugénol, le benzaldéhyde et l'anisole. Les composés aromatiques se trouvent souvent dans les feuilles et les fleurs des plantes.

Un certain nombre de voies existent pour la formation de composés benzénoïdes à partir d'hydrates de carbone. Chez les plantes supérieures, Neish (1960) détaille les voies du shikimate et de l'acétate. Il a été démontré que la voie de l'acétate opère pour la synthèse du cycle A des flavonoïdes (métabolites secondaires végétaux à structure polyphénolique) et probablement d'autres anneaux portant des hydroxyles méta les uns aux autres sont également formés à partir de cette voie. La voie du shikimate serait responsable de la formation de composés secondaires des plantes.

2.1.4 Composés contenant de l'azote et du soufre

Les hétérocycles aromatiques organiques d'azote et de soufre sont dérivés de cycles carbones aromatiques avec un hétéroatome se substituant à un atome de carbone du cycle ou à un groupe CH = CH complet. La présence d'hétéroatomes entraîne des modifications significatives de la structure moléculaire cyclique en raison de la disponibilité de paires d'électrons non partagés et de la différence d'électronégativité entre les hétéroatomes et le carbone (García-Valverde and Torroba 2005). Les émissions de composés organiques contenant du soufre et de l'azote sont réduites en volume. Ils ont cependant une grande importance du point de vue des nuisances olfactives et de la pollution de l'air (Harrison 1986).

McCormick et al. (2014) ont démontré que deux composés mineurs contenant de l'azote, le 2- et le 3-méthylbutyraldoxime étaient très attractifs pour des guêpes parasitoïdes de l'espèce *Glyptapanteles liparidis* lorsqu'ils étaient testés seuls, et induisaient des réponses physiologiques plus fortes que la plupart des sesquiterpènes et des volatils de feuilles vertes. Tous ces composés sont dégagés au moment des dégâts de feuilles de peuplier noir (*Populus nigra*) par des chenilles de *Lymantria dispar*. Ces aldoximes ont également attiré une communauté naturelle de parasitoïdes dans le champ, suggérant que plusieurs ennemis des herbivores pourraient utiliser ces composés mineurs (azotés) pour localiser leurs hôtes sur le feuillage du peuplier. Des composés mineurs pourraient être d'une grande importance pour caractériser l'effet sur le comportement. Cependant, l'effet des substances volatiles mineures des plantes ne peut pas être attribué à des composés individuels seulement, mais principalement au mélange des composés (Clavijo Mccormick et al. 2014).

2.2 Volatils émis par les insectes

2.2.1 Les phéromones

Les phéromones sont des messages chimiques qui induisent une réaction comportementale caractéristique ou un processus de développement chez les individus de la même espèce. Le terme est dérivé du grec *pherein* pour "transfert" et *hormōn* pour "exciter" et a été inventé en 1959 par le biochimiste allemand Peter Karlson et l'entomologiste suisse Martin Lüscher lors de leurs

recherches sur les composés chimiques qui régulent le développement des castes chez les termites (Karlson and Lüscher 1959).

Les phéromones se divisent en deux grands groupes :

- Phéromones modificatrices (primers) : elles induisent des modifications importantes sur la physiologie de l'insecte. *e.g.*, la phéromone BP (ou Brood Pheromone) larvaire induisant les soins au couvain par les ouvrières.
- Phéromones incitatrices : elles agissent sur le comportement, et sont classées selon le type de réponse :

→ Phéromone de piste : elles sont utilisées par les insectes sociaux pour tracer une piste d'odeur que d'autres membres de l'espèce peuvent suivre pour les guider du nid à une source de nourriture et vice-versa. Elles sont généralement employées par les fourmis, les abeilles et les termites (Harborne 1993).

→ Phéromone d'agrégation : elles attirent les conspécifiques des deux sexes et sont particulièrement courantes chez les insectes et autres arthropodes qui exploitent des sources de nourriture inégales dans leur distribution et sporadiquement disponibles. Ces phéromones médient la formation d'un groupe d'individus dans le but de se nourrir, de s'accoupler, d'écraser des prédateurs ou de combattre la résistance de l'hôte par une attaque de masse (Ginzel 2010).

→ Phéromone d'alarme : ce sont généralement des composés volatils qui sont libérés par des insectes clonaux ou sociaux en réponse à une perturbation. Ces signaux peuvent être des monoterpènes, des sesquiterpènes ou des hydrocarbures aliphatiques à chaîne courte. Ils comprennent souvent des mélanges de composés et sont moins spécifiques que d'autres types de phéromones (Ginzel 2010).

→ Phéromones épidéictiques (ou d'espacement) : les insectes non sociaux émettent généralement des signaux chimiques qui marquent leurs œufs ou modèlent l'espacement des populations. Beaucoup de ces composés sont le résultat de la concurrence pour des ressources limitées (Ginzel 2010).

→ Phéromone sexuelles : elles peuvent être produites par l'un des deux sexes et annoncer l'identité et le statut de l'expéditeur dans le but d'attirer un partenaire. Ces phéromones comprennent des composés spécifiques ou une combinaison hautement spécifique de plusieurs composés (Ginzel 2010).

2.2.2 Les hydrocarbures cuticulaires (CHC)

La cuticule de tous les insectes est recouverte d'une très fine couche (dite « épicuticulaire ») de cire. Cette couche est constituée de lipides, une classe de composés qui comprend des hydrocarbures, des alcools, des acides gras, des cires, des glycérides, des phospholipides et des glycolipides (Gibbs and Crockett 1998). La cuticule protège les insectes de diverses conditions, mais l'une des caractéristiques les plus importantes est la protection contre la perte d'eau transcuticulaire. Chez la plupart des insectes, les principaux composés de la couche de cire (lipide) sont les hydrocarbures. Un hydrocarbure est une molécule organique constituée uniquement de carbone et d'hydrogène. Les hydrocarbures sécrétés par une série de glandes sur la cuticule de l'insecte sont appelés hydrocarbures cuticulaires (CHC) et sont biologiquement très stables,

possédant tous la même structure de base qui est une longue chaîne carbonée, généralement composée de 19 à 35 atomes de carbone chez les insectes (Lockey 1988, Kaib et al. 1991).

Les CHC sont produits dans les cellules abdominales sous-cuticulaires (oenocytes) qui sont probablement le site de production d'hydrocarbures cuticulaires chez la plupart des insectes (*e.g.* mouches, moustiques, criquets, cafards) (Ferveur 1997, Schal et al. 1998, Martin and Drijfhout 2009). Les CHC sont également importants pour la communication intra et interspécifique (Howard and Blomquist 2005, Leonhardt et al. 2016). Servant de phéromones sexuelles dans de nombreux insectes solitaires (Jallon 1984, Thomas and Simmons 2009), ils jouent un rôle fondamental chez les insectes sociaux, car ils sont le principal moyen de communication. Ils sont donc indispensables au fonctionnement de la colonie.

Les hydrocarbures peuvent exister sous forme saturée ou insaturée. Sous la forme saturée (appelés *n*-alkanes), tous les atomes de carbone sont réunis par des liaisons simples, tandis que les composés insaturés ont une (alkènes), deux (diènes) ou trois (triènes) doubles liaisons à différentes positions le long de la chaîne. Les insaturations peuvent exister sous deux formes isomères. Celles-ci sont appelées forme *cis* (ou *Z*-) ou forme *trans* (ou *E*-). Un groupe spécial de composés saturés sont les hydrocarbures à ramification méthyle (methyl-branched hydrocarbons en anglais), qui ont un ou plusieurs groupes méthyle (CH_3) attachés à un ou plusieurs des atomes de carbone dans la chaîne, soit près de l'extrémité ou au milieu de la chaîne (Drijfhout et al. 2009).

Millar (2000) a démontré que les CHC constituent une deuxième classe majeure de phéromones de lépidoptères, différents des acétates, alcools et aldéhydes en C_{10}-C_{18} que l'on trouve couramment chez d'autres espèces.

2.2.3 Autres volatils d'insectes

Il existe également d'autres composés volatils émis par les insectes, issus des excréments, des miellats ou des exuvies qui dégagent des molécules odorantes. Anderson et al. (1993) ont démontré un effet répulsif chez les femelles de la noctuelle *Spodoptera littoralis* pour le mélange de cinq terpènes et le benzaldéhyde, des composés identifiés dans les excréments des larves. Ces composés ont un effet répulsif lorsqu'ils sont en mélange, mais l'absence de l'un d'eux entraîne la perte de cet effet.

Les insectes piqueurs-suceurs (*e.g.* pucerons, aleurodes, cochenilles) sécrètent un liquide visqueux appelé miellat, issu des produits de digestion qui ne sont ni assimilés ni transformés. Il a été démontré que cette substance agit comme une kairomone, qui peut être détectée par d'autres insectes tels que certains parasitoïdes, ainsi que par les fourmis qui se nourrissent de ce miellat (Bouchard and Cloutier 1984, Du et al. 1997, Styrsky and Eubanks 2007). Une étude réalisée sur des punaises de lit (*Cimex lectularius*) a démontré que l'exuvie contient également des substances volatiles, comme les aldéhydes, qui ont un effet sur le comportement des adultes (Choe et al. 2016).

3 Odorants et odeurs

Les molécules volatiles décrites ci-dessus sont appelées des odorants, mais elles ne se rencontrent généralement pas seules dans l'environnement. Ainsi, elles forment des mélanges

complexes, dont la résultante est appelée odeur. Par exemple, l'odeur naturelle de la fraise est composée de plus d'une centaine d'odorants différents (bien que l'on puisse l'imiter avec juste une dizaine de composés différents). Autre exemple, les phéromones sexuelles des papillons de nuit sont également constituées d'un mélange de composés, mais en plus petit nombre (1 à 10 environ).

Selon les ratios des odorants, l'odeur résultante peut varier. Également, les proportions de substances volatiles émises par certaines espèces de plantes changent au fil du temps (Johnson et al. 2004). Ces variations indiquent souvent un changement physiologique, une réaction à un stress chez la plante et peuvent entraîner des préférences temporelles pour certains plantes hôtes par l'insecte.

3.1 L'environnement odorant des insectes

Les insectes rencontrent un large éventail de molécules odorantes, mais toutes ne sont pas détectées. Chaque espèce possède son propre "espace olfactif", c'est à dire l'ensemble des odorants qu'elle est capable de sentir, avec plus ou moins de sensibilité. Et cet espace peut varier au cours du développement ou en fonction de la physiologie de l'individu. Par exemple les moustiques (*e.g. Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti…*) cherchent des signaux volatils de sources de nectar pour se nourrir, mais les femelles ont besoin également d'un repas de sang pour la ponte, donc elles sont capables de détecter le CO_2, l'odeur de peau et la sueur des vertébrés endothermes (mammifères, oiseaux) dont les humains (Bernier et al. 2000, Meijerink et al. 2000, Verhulst et al. 2009, Nyasembe and Torto 2014).

Les insectes phytophages, eux, sont particulièrement sensibles aux odeurs de plantes. Chez les noctuelles, la préférence des femelles envers des plantes-hôtes pour la recherche de nourriture et de sites d'oviposition a été beaucoup étudiée. Par exemple, les femelles non accouplées de *S. littoralis* sont fortement attirées par les fleurs de lilas (*Syringa vulgaris*). Après l'accouplement, l'attraction pour l'odeur florale est supprimée et les femelles volent plutôt vers l'odeur de feuille de la plante, qui représente un lieu propice à la ponte (Saveer et al., 2012). La ponte sur une plante non endommagée fournira aux larves nouvellement émergées des tissus foliaires contenant de plus faibles concentrations en composés de défense, ce qui augmentera leur taux de survie et de développement (Anderson et al. 1995, Anderson and Agrell 2005, Thöming et al. 2013, Zakir et al. 2013).

3.1.1 Distribution d'un panache d'odeur

Les insectes localisent de nombreuses ressources importantes pour la survie et la reproduction en suivant les panaches d'odeur portés par le vent depuis leur source. Les panaches sont des distributions éparses de paquets d'odeurs à haute concentration entrecoupés d'air pur. Une localisation réussie de la source d'odeur nécessite principalement la présence de l'odeur attractive et la détection de la direction du vent qui porte cette odeur (Cardé and Willis 2008). Le poids moléculaire d'une molécule a un impact significatif sur le temps nécessaire à l'établissement d'un gradient de concentration sur un volume donné de fluide. Lorsque la diffusion moléculaire est la

principale force motrice de la distribution des molécules, le seul signal disponible pour un animal est le produit chimique lui-même et son gradient spatio-temporel (Vickers 2000).

La dispersion de l'odeur dans le vent est dominée par les forces de la diffusion turbulente qui étirent et remuent les filaments d'odeur lorsqu'ils sont libérés de la source d'odeur, créant simultanément des espaces d'air sans odeur dans le panache lorsqu'il se dilate et est transporté sous le vent (Murlis et al. 1992). Les insectes qui naviguent le long de panaches turbulents rencontrent ainsi des odeurs par rafales parsemées de poches d'air pur (Figure 2)(Cardé and Willis 2008).

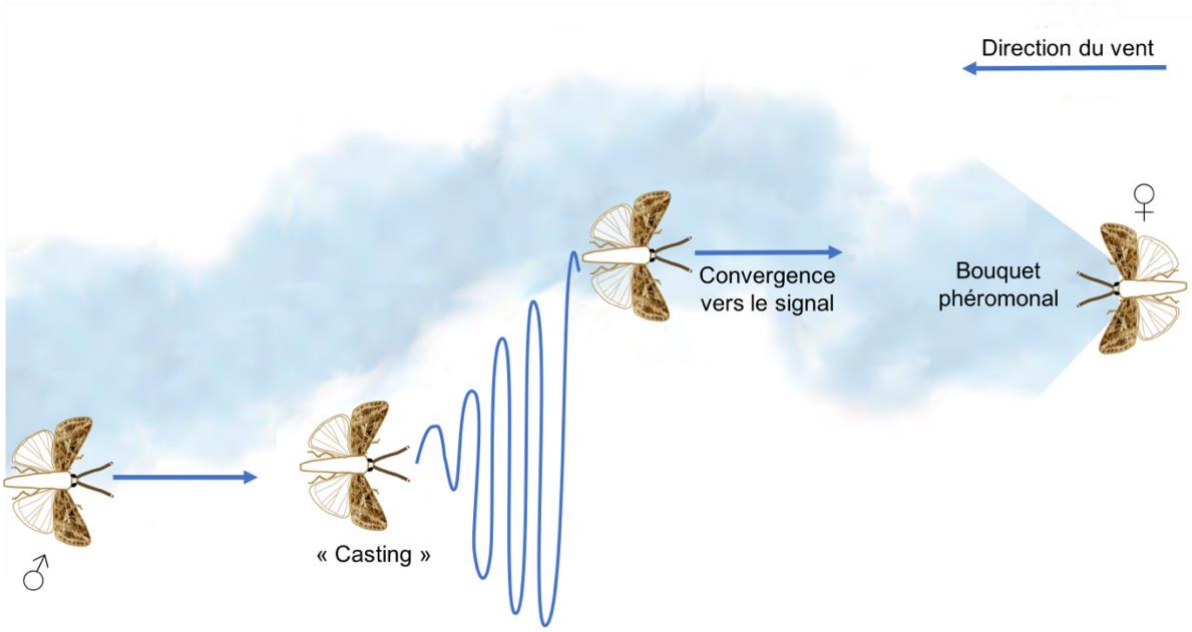


Figure 2. Illustration du comportement de convergence vers le signal d'un papillon mâle, vers le panache de phéromone de la femelle (adapté de Lopez et al. 2011).

Une stratégie utilisée par les papillons de nuit pour retrouver le panache de phéromone perdu s'appelle «casting» (Figure 2), au cours de laquelle le déplacement contre le vent cesse et le papillon vole en zigzags latéraux de plus en plus larges à travers la ligne de vent (David et al. 1983). Le schéma typique de zigzag peut être moins évident chez certaines espèces et la sinuosité du vol du mâle contre le vent peut être plus influencée par la structure du panache de phéromone que par les changements de concentration en phéromone (Mafra-neto and Carde 1994).

PARTIE II : Le système olfactif chez l'insecte

Le système olfactif de l'insecte est divisé en deux grandes parties :
- le système périphérique qui permet la détection des molécules odorantes grâce à des organes spécialisés contenant des neurones sensoriels olfactifs (OSN). Ces OSN sont des neurones bipolaires dont les dendrites assurent la détection des signaux et dont les axones transportent l'information le long du nerf antennaire jusqu'au système nerveux central, au niveau des lobes antennaires, qui envoie ensuite le signal traité aux centres d'intégration supérieurs du cerveau. La partie **1** de cette section, développe en détail les informations concernant le système olfactif périphérique, les organes impliqués et leur fonctionnement.
- le système central, réseau de neurones permettant l'intégration des informations reçues depuis le système périphérique pour engendrer une réponse adaptée au stimulus. Le système central est constitué des lobes antennaires, premier relai synaptique, ainsi que des corps pédonculés et des cornes latérales, les centres olfactifs supérieurs. Dans la partie **2**, le fonctionnement et la structure du système olfactif central sont précisés plus en détail.

1 Morphologie et anatomie des organes olfactifs périphériques : antennes, sensilles et neurones sensoriels olfactifs

Le système olfactif périphérique d'un insecte est constitué d'organes olfactifs qui abritent des neurones sensoriels olfactifs (OSN). Ces principaux organes sont une paire d'antennes et de deux paires de palpes, maxillaires et labiaux (sauf chez les insectes qui se nourrissent de liquide, chez qui au moins une paire de palpes est perdue).

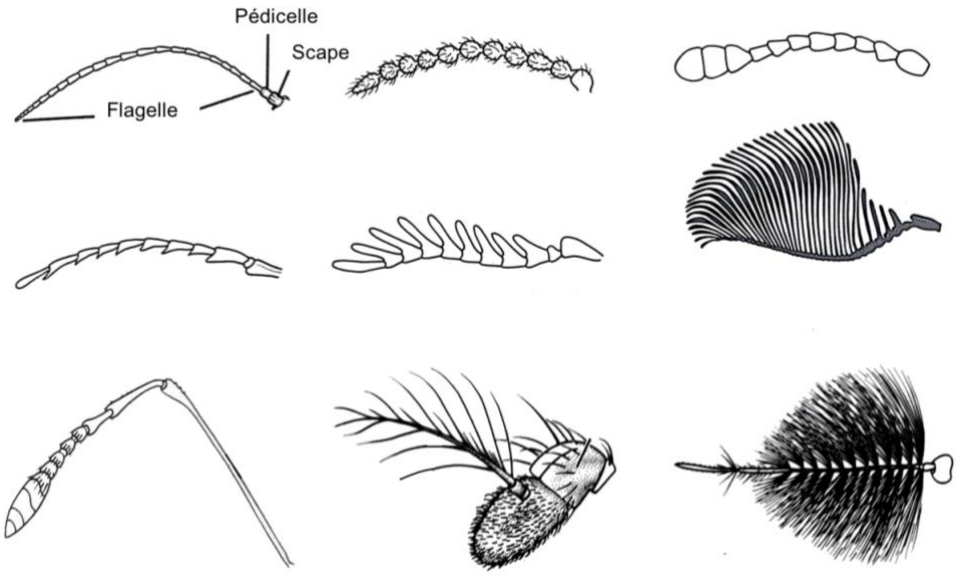


Figure 3. Différents types d'antennes d'insectes (adapté de Gullan and Cranston (1994)).

La morphologie des antennes est très variable en fonction des espèces (Figure 3). Elles sont généralement plus grandes ou plus élaborées au stade adulte que dans les insectes juvéniles (Loudon 2009). Les antennes sont recouvertes de structures semblables à des soies, appelées sensilles (Figure 4). C'est dans ces sensilles que se trouvent les OSN, et il peut y avoir un nombre variable par sensille.

Le nombre et le type de sensilles présentes sur les appendices chimiosensoriels varient selon les espèces, leur stade de développement (par exemple, les larves par rapport aux adultes) ainsi que le sexe. Ces structures ont été classées en fonction de leurs morphologies principalement en trois types : basiconiques, trichoïdes et coeloconiques (Figure 5)(Schneider 1969, Cornford et al. 1973, Su et al. 2009). D'autres types de sensilles non olfactives mais qui jouent un rôle gustatif, mécano- ou hydro-sensoriel sont aussi présentes, comme les sensilles chaetiques, styloconiques, squamiformes, auricilliques, « uniporous peg » sensilla, etc... (Faucheux 1985, Seada 2015, Yi et al. 2016). Elles peuvent être reconnues et distinguées par des différences de taille, de forme et de sculpture en surface. Ainsi, les sensilles olfactives ont leur cuticule percée de pores qui permettent l'entrée des odorants, tandis que les sensilles gustatives n'ont qu'un seul pore terminal.

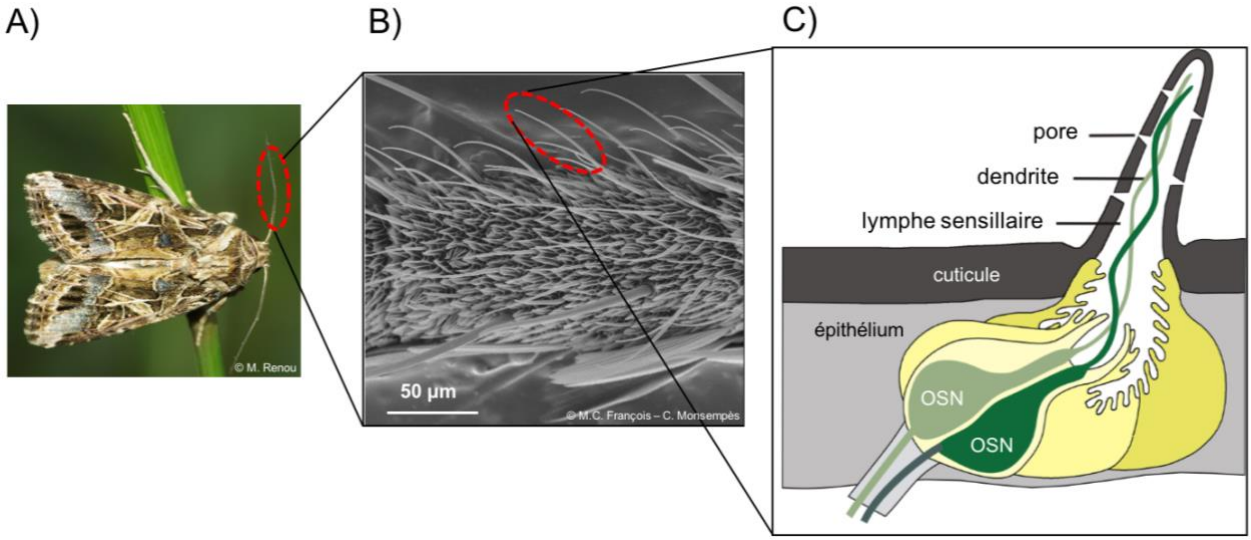


Figure 4. A : Photo du papillon de nuit *Spodoptera littoralis*. **B :** Photo de microscopie électronique à balayage d'une antenne de mâle du papillon *Spodoptera littoralis.* **C :** Schéma d'une sensille olfactive (OSN : neurone sensoriel olfactif).

1.1 Sensilles olfactives : l'exemple de la drosophile

C'est chez la drosophile que la morphologie des sensilles olfactives et la fonction des différents types sensillaires ont été étudiées le plus en détail (Figure 5). Une brève description des principales classes de sensilles est présentée ci-dessous.

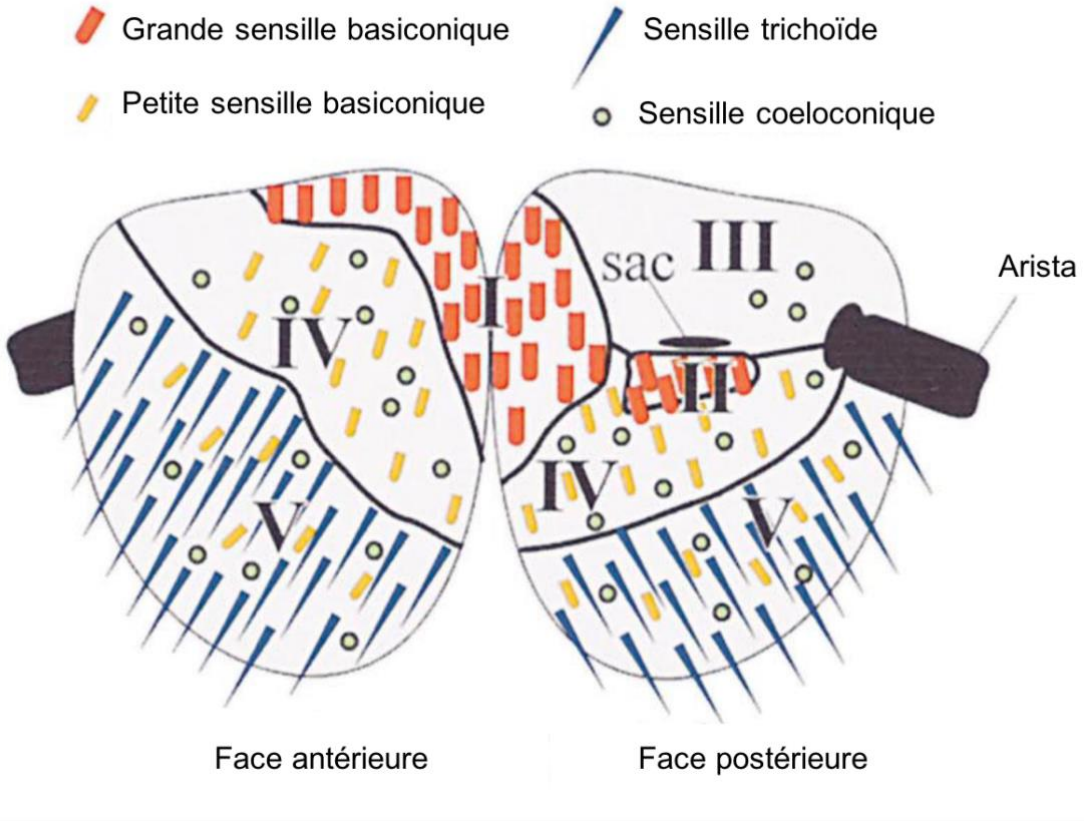


Figure 5. Distribution des différents types des sensilles sur l'antenne de *Drosophila melanogaster* (d'après De Bruyne et al. 2001). Sac: sacculus. I-V: zones distinguables.

1.1.1 Les sensilles trichoïdes

Les neurones situés dans ce type de sensilles répondent peu à la plupart des odeurs, mais sont efficaces pour détecter les phéromones (Clyne et al. 1997, Hallem and Carlson 2006, van der Goes van Naters and Carlson 2007). L'activation de neurones des sensilles trichoïdes chez la drosophile est à la fois nécessaire et suffisante pour générer un comportement sexuel stéréotypé provoqué par la phéromone 11-cis-vaccényl-acétate (cVA) (Ha and Smith 2006, Kurtovic et al. 2007). Cette division fonctionnelle entre les types de sensilles semble être conservée au cours de l'évolution, car d'autres insectes détectent également les phéromones avec des sensilles trichoïdes (De Bruyne and Baker 2008), comme les papillons de nuit.

1.1.2 Les sensilles basiconiques

Celles-ci se divisent en deux sous-types morphologiques, les grandes sensilles basiconiques (Venkatesh and Singh 1984) et les petites sensilles basiconiques. Les sensilles basiconiques contiennent deux ou quatre neurones qui détectent principalement les odeurs de fruits et de micro-organismes (Figure 6)(Clyne et al. 1997, De Bruyne et al. 2001). Ces types de sensilles sont

présents sur l'antenne et les palpes maxillaires (Clyne et al. 1997, de Bruyne et al. 1999). Sept types fonctionnels ont été identifiés chez la drosophile (figure 6) (De Bruyne et al. 2001).

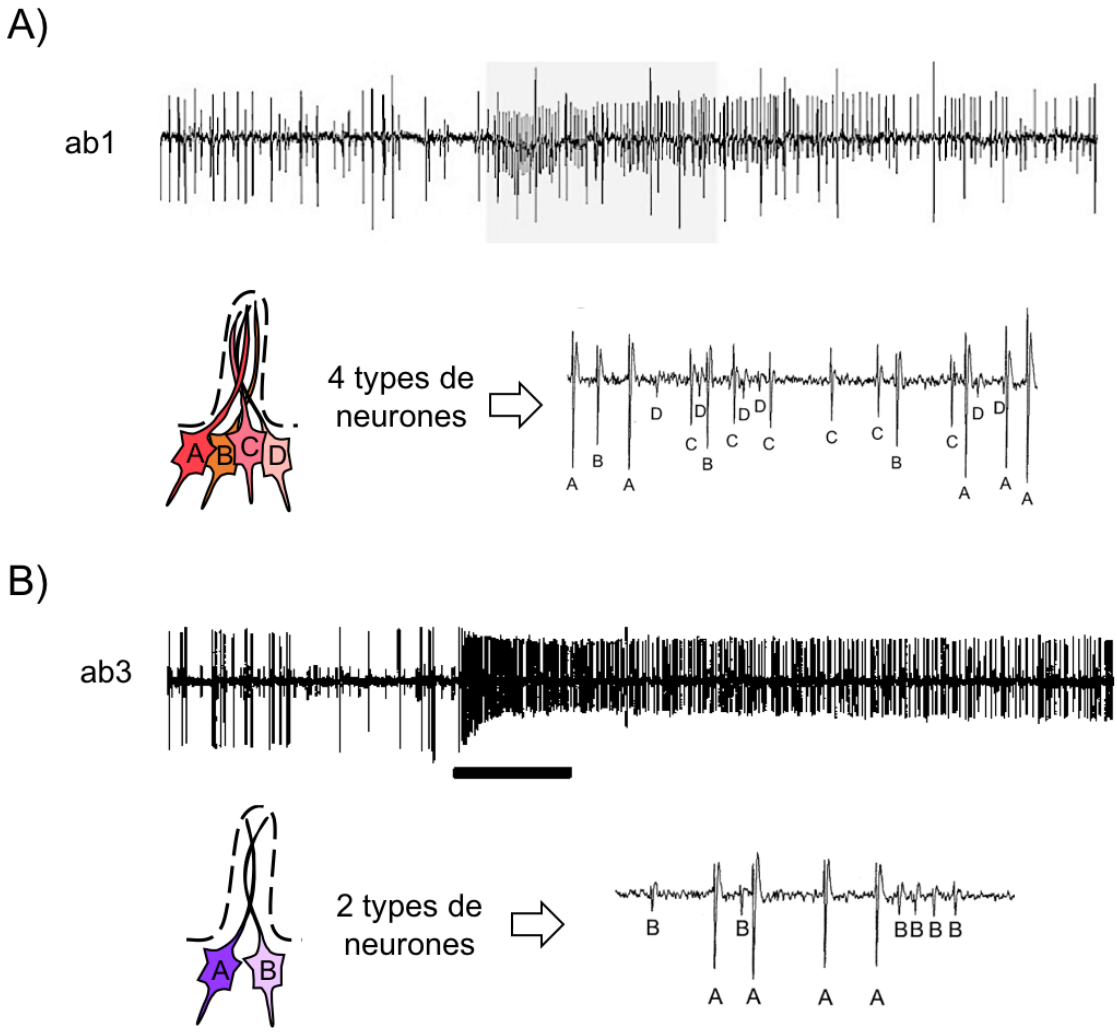


Figure 6. **Réponses électriques typiques de 2 types de sensilles basiconiques, mesurées en enregistrement électrophysiologique monosensillaire (SSR). A :** Sensille ab1 d'une drosophile où l'activité spontanée de quatre OSN (A,B,C,D) peut être observée. **B :** Sensille ab3 d'une drosophile, où on observe l'activité de deux OSN (A,B) (adapté de De Bruyne et al. 2001, Gonzalez et al. 2016, Chin et al. 2018).

1.1.3 Les sensilles coeloconiques

Ce sont les plus petites sensilles, avec une forme caractéristique très différente des autres types de sensilles (Yao et al. 2005). Contrairement aux autres, elles contiennent deux parois, une extérieure et une intérieure à la base de la sensille, et la lymphe sensillaire est beaucoup plus dense que chez les autres types (Shanbhag et al. 1999). Ce type de morphologie a été conservé au cours de l'évolution des insectes, et il semble présent chez tous les insectes, ce qui pourrait suggérer qu'il a une fonction critique dans le codage chimiosensoriel (Steinbrecht 1997). Les neurones des sensilles coeloconiques ont montré des réponses excitatrices aux acides carboxyliques et aux

amines. Les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur la drosophile ont identifié quatre types fonctionnels distincts de sensilles cœloconiques sur la surface antennaire (ac1, ac2, ac3, ac4). Chaque type contient au moins deux OSN, et il existe au moins sept classes d'OSN distinctes (Yao et al. 2005).

1.2 Types de sensilles chez les Lépidoptères

Chez les lépidoptères, le rôle des sensilles basiconiques et trichoïdes a été exploré depuis plusieurs années, principalement chez les espèces ravageuses des cultures. Les OSN des sensilles basiconiques détectent les odeurs de fleurs, les volatils des feuilles vertes, les excréments des larves, et d'autres odeurs de plantes hôtes. Ce type de sensilles permet aux papillons de détecter les sources de nourriture provenant principalement des fleurs et feuilles et ensuite les plantes propices pour l'oviposition (Anderson et al. 1993, Martel et al. 2009, Riffell et al. 2009, Saveer et al. 2012). Les sensilles trichoïdes servent à la détection de phéromones.

Les Lépidoptères possèdent d'autres types des sensilles en dehors de celles déjà mentionnés ci-dessus. Celles-ci seront brièvement détaillées ci-dessous :

1.2.1 Les sensilles auricillica

Aussi appelées « rabbit ear sensilla » en anglais, elles possèdent des OSN qui répondent aux substances volatiles des plantes (Mochizuki et al. 1992, Anderson et al. 2000, Ansebo et al. 2005, Binyameen et al. 2012, Seada 2015). Certaines études suggèrent également qu'elles seraient impliquées dans la détection de la phéromone sexuelle (Ebbinghaus et al. 1997, Anderson et al. 2000, Faucheux 2006).

1.2.2 Les sensilles chaetiques

Ce type de sensilles ressemble aux sensilles trichoïdes, à la différence que ses parois sont beaucoup plus épaisses (Seada 2015). On les trouve à des endroits précis de chaque segment de l'antenne et également dans les palpes, le proboscis et les tarses (Lee and Strausfeld 1990, Seada et al. 2018). Chez les noctuelles *Heliothis virescens et Spodoptera littoralis*, les sensilles chaetiques ont des fonctions mécano-réceptrices mais également gustatives (Jørgensen et al. 2007, Seada et al. 2018).

1.2.3 Les sensilles styloconiques

À fort grossissement, la sensille semble être perforée par un pore apical, indiquant un rôle gustatif (Faucheux 1985). La jonction entre la sensille et la protubérance lui donne un aspect flexible (Grimes and Neunzig 1986). Ce type de sensille a été identifié sur les antennes adultes et dans les palpes maxillaires de larves de plusieurs lépidoptères, des études montrent que ce type des sensilles abritent des neurones gustatifs (Schoonhoven and Van Loon 2002).

1.2.4 Les sensilles squamiformia

Présentes normalement chez les lépidoptères, ces sensilles sont entourées d'une épaisse cuticule et d'une membrane de la cavité basale. Elles ne présentent pas de pores au niveau de la paroi. Par conséquent, leur morphologie et leur distribution suggèrent une fonction mécano-réceptrice (Seada 2015).

1.3 Comparaison des organes olfactifs périphériques des papillons et des chenilles

Les antennes des papillons adultes portent des milliers de sensilles olfactives, chacune abritant deux ou trois OSN (Ljungberg et al. 1993). Le nombre des sensilles varie en fonction des espèces, du sexe et du stade de développement (Hallberg et al. 1999). Chez les mâles existent 75-100 sensilles trichoïdes par segment, contre 50-60 par segment pour les femelles chez *S. littoralis* (Ljungberg et al. 1993). Les sensilles basiconiques ont été documenté seulement chez les femelles ou se trouvent 38 sensilles par segment (Binyameen et al. 2012).

Chez les papillons de nuit, le mâle est le « récepteur » du signal phéromonal utilisé dans l'attraction à longue distance précédant l'accouplement, tandis que les femelles sont généralement celles qui émettent ce signal. Après l'accouplement, la femelle doit trouver un site approprié pour l'oviposition, afin d'assurer la survie de sa progéniture. Ces différents comportements se reflètent également dans le nombre et le type de sensilles portées par les antennes, et donc dans le type d'OSN présent dans les antennes des mâles et des femelles. L'antenne des mâles porte essentiellement des sensilles trichoïdes et est dominée par des OSN qui répondent aux composants des phéromones sexuelles. En plus de ces neurones, un nombre variable de neurones répondant à certains composés des plantes sont présents. Les antennes des femelles sont principalement composées de sensilles contenant des OSN impliqués dans la sélection de la plante hôte ou du site de ponte, mais portent également quelques sensilles et OSN impliqués dans la détection de phéromones sexuelles mâles (Anderson et al. 1995).

Le nombre d'OSN est lié au nombre d'OR exprimés dans chaque espèce, chez *S. littoralis* l'analyse des nouveaux transcriptomes et du génome (non-publié) ont permis l'identification d'environ 70 OR candidats. On peut donc s'attendre selon la règle "un récepteur – un neurone" (Touhara et al. 1999) qu'il reste encore un nombre important d'OSNs à être caractérisé pour mieux comprendre le système olfactif périphérique de cette espèce.

Contrairement aux adultes, les larves de lépidoptères possèdent des organes olfactifs morphologiquement très différents, qui consistent essentiellement en deux petites antennes et deux palpes maxillaires, avec un nombre réduit des sensilles et d'OSN. Les chenilles possèdent également des préférences alimentaires qui diffèrent considérablement par rapport à l'adulte, elles peuvent détecter et se déplacer vers des COV de plantes, qui seront des potentielles sources de nourriture (Schoonhoven and Van Loon 2002, de Fouchier et al. 2018). Plus d'informations sur le système olfactif des larves seront détaillées ci-dessous.

1.4 L'équipement chimiosensoriel des chenilles

Une paire d'antennes et une paire de palpes maxillaires assurent la détection olfactive chez les chenilles de Lépidoptères. La morphologie de l'antenne est assez différente de celle des adultes. L'antenne des larves de lépidoptères ne comprend que trois petits segments où le segment médian (S2) et le segment apical (S3) portent un total de neuf sensilles avec des morphologies différentes. On trouve une sensille styloconique, deux longues sensilles chaetiques, trois petites sensilles basiconiques et trois grandes sensilles basiconiques (Figure 7) (Zielonka et al. 2016). Parmi les différents types de sensilles, seules les grandes sensilles basiconiques sont classées morphologiquement et fonctionnellement comme des structures olfactives, alors que les autres types sont supposés remplir des fonctions gustatives ou mécano-sensorielles (Schoonhoven 1987, Laue 2000).

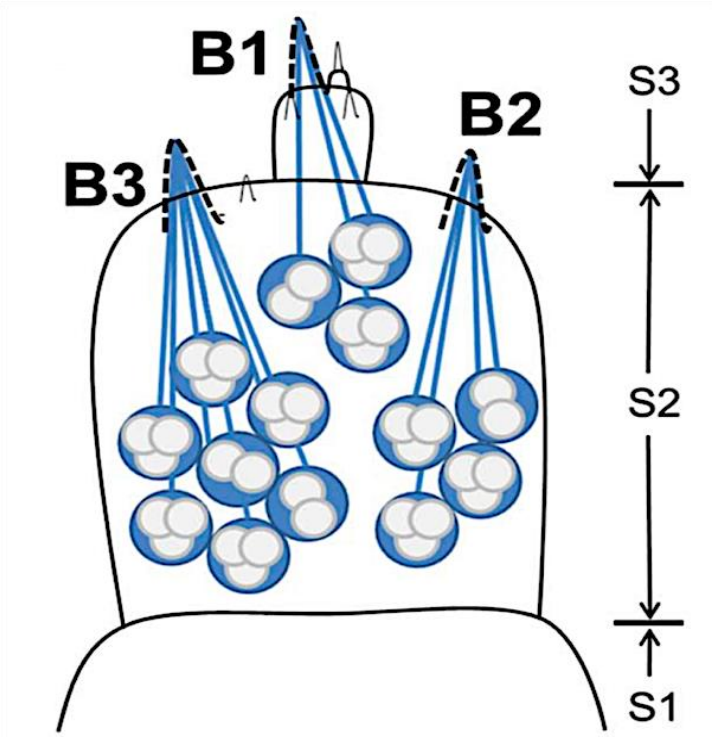


Figure 7. **Dessin de la morphologie de l'antenne de larve de Lépidoptères**. S1, S2, S3 indiquent les trois segments de l'antenne et on peut observer les OSN (en blanc) logés à la base des grandes sensilles basiconiques olfactives (d'après Zielonka et al. 2016).

Même si la plupart des études ont considéré les antennes comme étant les organes principaux pour la détection d'odeurs, d'autres organes comme les palpes maxillaires abritent également des sensilles olfactives, plus précisément un total de huit sensilles (soit presque autant que les antennes) : sept sensilles basiconiques et une sensille styloconique (Grimes and Neunzig 1986, Roessingh et al. 2007). Les huit sensilles situées à l'extrémité des palpes (Figure 8) ont été caractérisées électrophysiologiquement comme étant des chimiorécepteurs, et il a été suggéré que cinq d'entre elles ont une fonction gustative (et peuvent même abriter des récepteurs au CO_2) et trois une fonction olfactive (Keil 1996).

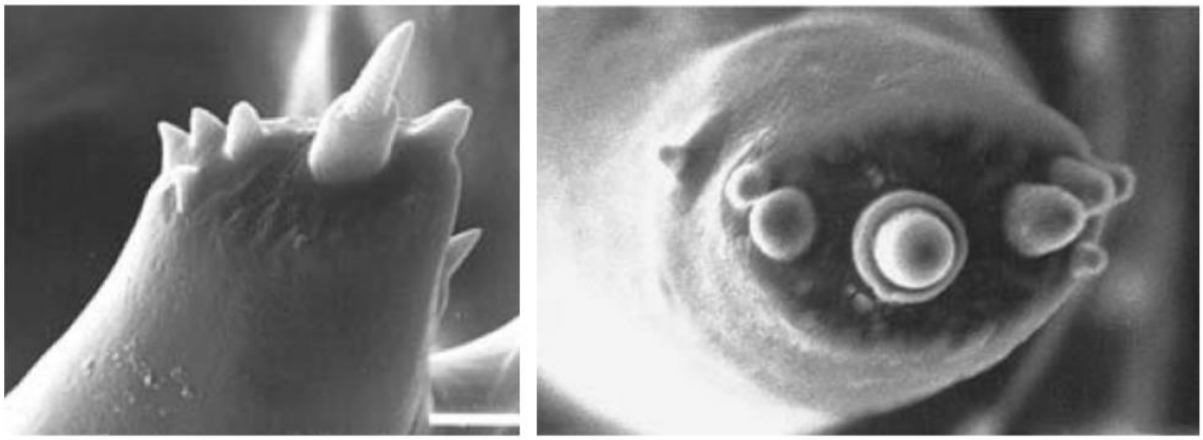


Figure 8. Palpes maxillaires d'une larve de *Yponomeuta cagnagellus.* 8 sensilles sont visibles sur les images. D'après Roessingh et al. 2007.

Les chenilles possèdent environ 78 OSN sur les palpes maxillaires et les antennes (Dethier and Schoonhoven 1969). Au total, 38 OSN ont été trouvés dans l'antenne des larves de *Heliothis virescens* en utilisant des méthodes d'hybridation *in situ* à fluorescence. Le nombre d'OSN et la distribution spatiale semble être conservés pendant le développement larvaire de différentes espèces de noctuelles (Zielonka et al. 2016).

2 Anatomie du système olfactif central

2.1 Centre olfactif primaire

2.1.1 Le lobe antennaire

Le premier relais de l'information olfactive dans le cerveau de l'insecte est le lobe antennaire (AL), une structure commune à tous les insectes, et secondairement perdue chez certaines espèces anosmiques (Strausfeld and Hildebrand 1999, Hansson and Anton 2000). Sa structure et sa fonction sont analogues à celles du bulbe olfactif chez les vertébrés, mais ils ont évolué indépendamment (Strausfeld and Hildebrand 1999). Le lobe antennaire contient des structures sphériques appelées glomérules, qui reçoivent chacune une entrée convergente de nombreux OSN présentant le même spectre de réponse (Figure 9).

La disposition et le nombre de glomérules au sein du AL sont largement spécifiques à l'espèce. Le nombre de glomérules varie en général entre 50 et 200 suivant les espèces (Anton and Homberg 1999). Le plus grand nombre a été trouvé chez la fourmi *Atta vollenweideri*, qui possède 442 glomérules (Kuebler et al. 2010). Le volume glomérulaire est déterminé en grande partie par le nombre d'OSN (Grabe et al. 2016). En plus des OSN, il existe deux grands types de neurones dans le lobe antennaire : les neurones de projection (PN ou « projection neuron » en anglais) et les neurones locaux (LN ou « local neurons » en anglais).

2.1.2 Les neurones de projection (PN)

Ce sont les seuls neurones qui transmettent l'activité induite par les odeurs aux centres supérieurs (Masse et al. 2009, Carey and Carlson 2011, Seki et al. 2017). Ils relient les glomérules individuels aux corps pédonculés et aux cornes latérales du protocérébron (Figure 9) (Stocker 1994, Ito et al. 1998). Les PN ont des synapses d'entrée et de sortie dans les glomérules olfactifs (Galizia and Sachse 2010). Généralement, de nombreux OSN convergent sur un même neurone de projection. L'entrée des neurones de projection dans la corne latérale est fortement stéréotypée dans l'espace (Marin et al. 2002, Wong et al. 2002, Tanaka et al. 2004, Jefferis et al. 2007).

2.1.3 Les neurones locaux (LN)

Ils peuvent être excitateurs ou inhibiteurs, et relient les glomérules les uns ou autres, permettant ainsi de moduler le signal. Il existe plusieurs types de LN chez les insectes. Deux classes sont distinguées pour des raisons morphologiques : un type innerve la plupart sinon tous les glomérules uniformément (homo LNs), l'autre innerve seulement quelques-uns (asymmetric LNs) (Anton and Homberg 1999, Galizia and Sachse 2010). Les glomérules possédant un spectre étroit d'activation par les odorants sont moins fréquemment innervés par les neurones locaux, ce qui indique que ces glomérules peuvent être moins intégrés dans le réseau interglomérulaire du AL (Grabe et al. 2016). L'innervation des neurones locaux chez la drosophile diffère considérablement entre individus, ce qui confirme la complexité et la variabilité des interneurones olfactifs locaux (Chou et al. 2010).

2.2 Centres olfactifs secondaires

Les neurones de projections ciblent à la fois les corps pédonculés (« mushroom bodies » en anglais) et les cornes latérales (« lateral horns » en anglais) (Figure 9) (Tanaka et al. 2004, Vosshall and Stocker 2007).

2.2.1 Les corps pédonculés

Ce sont des centres d'intégration contrôlant diverses fonctions telles que la mémoire et l'apprentissage olfactif ainsi que l'intégration multi-sensorielle (Heisenberg 2003, Davis 2005). Le corps pédonculé peut être considéré comme une structure analogue au cortex piriforme chez les mammifères (Su et al. 2009). Dans chaque hémisphère cérébral, environ 2000 à 2500 cellules de Kenyon intrinsèques, qui sont les cibles post-synaptiques des PN, assurent la médiation d'une variété de tâches, y compris l'acquisition, la consolidation et la récupération de la mémoire à court et à long terme, généralement sous la forme de la mémoire associative (Schultzhaus et al. 2017).

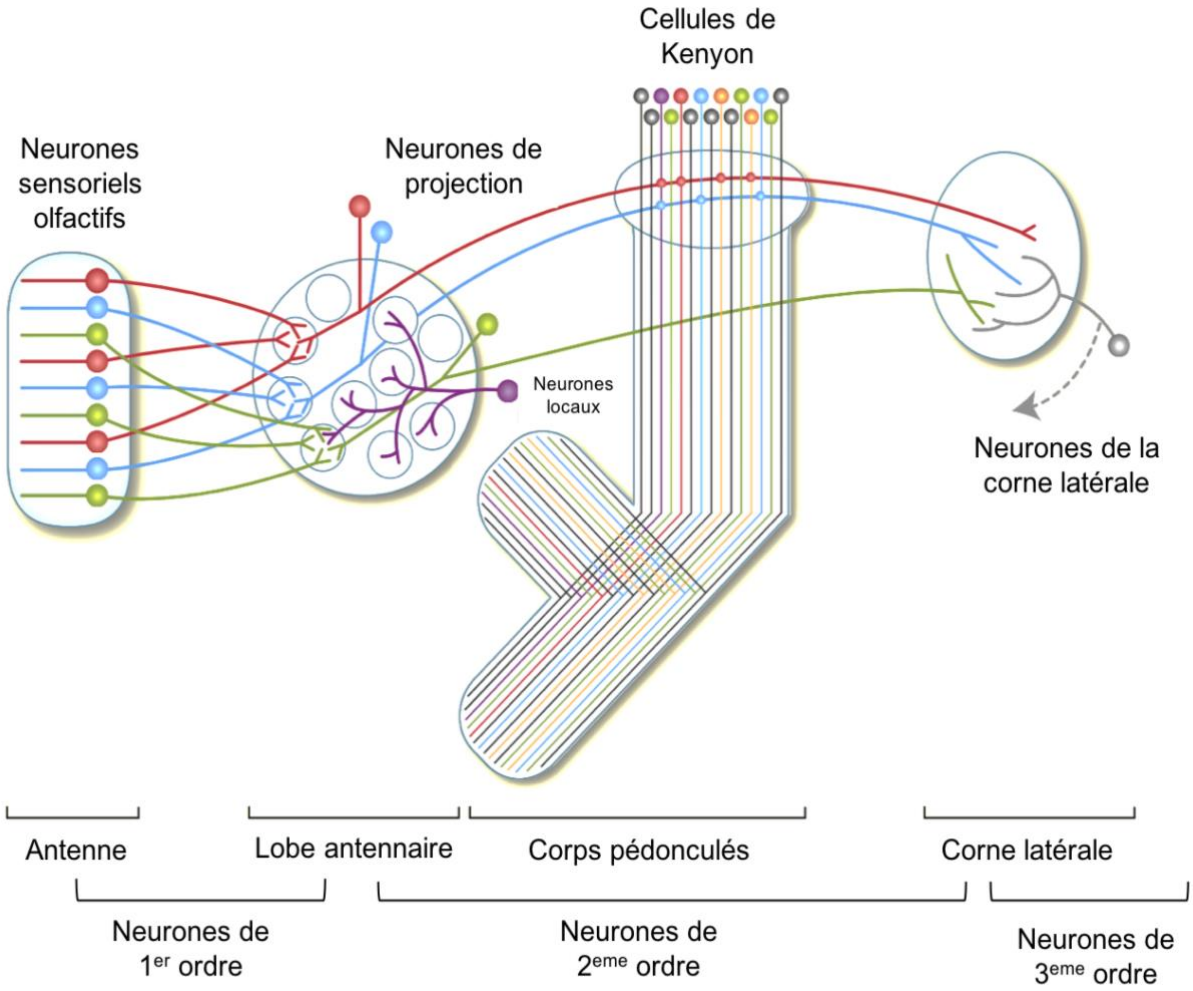


Figure 9. Représentation schématique de l'organisation du système olfactif chez la drosophile (adapté de Tanaka et al. 2004, Masse et al. 2009).

Chez des espèces telles que l'abeille ou le cafard, les corps pédonculés sont présents sous la forme de deux tiges massives (pédoncules) avec de grandes protubérances en forme de coupe (calices) à leurs extrémités dorso-caudales. Il semble que les corps pédonculés soient relativement plus grands chez les insectes sociaux, qui se démarquent au niveau de leur communication chimique (Heisenberg 2003).

2.2.2 Les cornes latérales

Les cornes laterales « lateral horns ou LH » en anglais sont impliquées dans le déclenchement des comportements olfactifs innés (de Belle and Heisenberg 1994, Tanaka et al. 2004). Les LH partagent de nombreuses similitudes avec l'amygdale des mammifères (Miyamichi et al. 2011, Sosulski et al. 2011). La représentation spatiale des LH ne présente pas de limites physiques distinctes et est définie par l'emplacement des terminaisons axonales des PN (Schultzhaus et al. 2017). Chez la drosophile, la taille des LH est 1% plus grande chez les mâles

que chez les femelles (Jefferis et al. 2007). Les régions des LH élargies aux mâles sont riches en entrées synaptiques des PN qui proviennent de glomérules du AL sexuellement dimorphiques (Kondoh et al. 2003, Stockinger et al. 2005). Ces glomérules reçoivent des axones d'OSN exprimant des OR qui répondent aux phéromones sexuelles (Couto et al. 2005, Datta et al. 2008).

Des études sur l'anatomie réalisées chez la drosophile et les criquets montrent que plusieurs neurones de la corne latérale ("Lateral horn neurons" ou LHN en anglais) étendent leurs projections à d'autres parties du cerveau, reliant spécifiquement des régions qui traitent d'autres modalités sensorielles. Certains LHN peuvent répondre à la fois aux odeurs et aux stimuli visuels, suggérant que les LHN jouent un rôle dans l'intégration de multiples formes d'informations sensorielles (Duistermars and Frye 2010, Gupta and Stopfer 2012).

2.3 Mécanismes périphériques : description des acteurs moléculaires

Dans les sensilles olfactives, les molécules odorantes diffusent à travers de nombreux pores situés à la surface des sensilles, ensuite elles pénètrent dans une lymphe aqueuse qu'elles traversent pour atteindre les récepteurs membranaires présents sur les dendrites des OSN (Steinbrecht 1997). C'est la liaison d'une molécule odorante à un récepteur membranaire qui permet la transduction du signal, c'est à dire la transformation du signal chimique en signal électrique (Figure 10). Si cette réponse électrique dépasse un certain seuil, l'OSN génère des potentiels d'action qui sont alors transmis via son axone jusqu'au système nerveux central (Suh et al. 2014).

2.3.1 Protéines olfactives solubles

Les odorants sont généralement hydrophobes, et ils doivent être solubilisés pour traverser la lymphe sensillaire. Ce rôle est attribué aux protéines de liaison aux odeurs ou OBP (Odorant-Binding Proteins) ainsi qu'aux CSP (Chemosensory proteins), qui sont de petites protéines solubles hautement concentrées dans la lymphe sensillaire (Pelosi et al. 2006), sécrétées par les cellules accessoires de la sensille. Ces protéines ont une structure tridimensionnelle assurée par des ponts disulfures, avec des domaines hélicoïdaux qui définissent une cavité hydrophobe pouvant accommoder les odorants (Sandler et al. 2000, Campanacci et al. 2003).

La structure des OBP est stabilisée par trois ponts disulfures entre des cystéines en position conservées (Leal et al. 1999, Scaloni et al. 1999). Ces OBP ne partagent en moyenne que 10-15% de leurs résidus entre espèces (Pelosi et al. 2006). Le rôle des OBP dans l'olfaction est débattu depuis longtemps. Il a été proposé qu'elles solubiliseraient les odorants dans la lymphe, qu'elles permettraient un premier tri de l'information par des liaisons plus ou moins spécifiques avec les odorants, ou encore qu'elles participeraient au nettoyage de la lymphe en encapsulant les odorants. Bien que les récepteurs membranaires soient responsables de la détection des signaux chimiques, il a été prouvé que les OBP sont également nécessaires pour la sensibilité physiologique du système olfactif (Pelletier et al. 2010). Cependant, un article récent mené sur plusieurs sensilles suggère qu'elles conservent leurs propriétés fonctionnelles de détection quand elles sont dépourvues de

leurs OBP. Ces protéines ne seraient donc pas toujours indispensables à la réponse olfactive (Xiao et al. 2019).

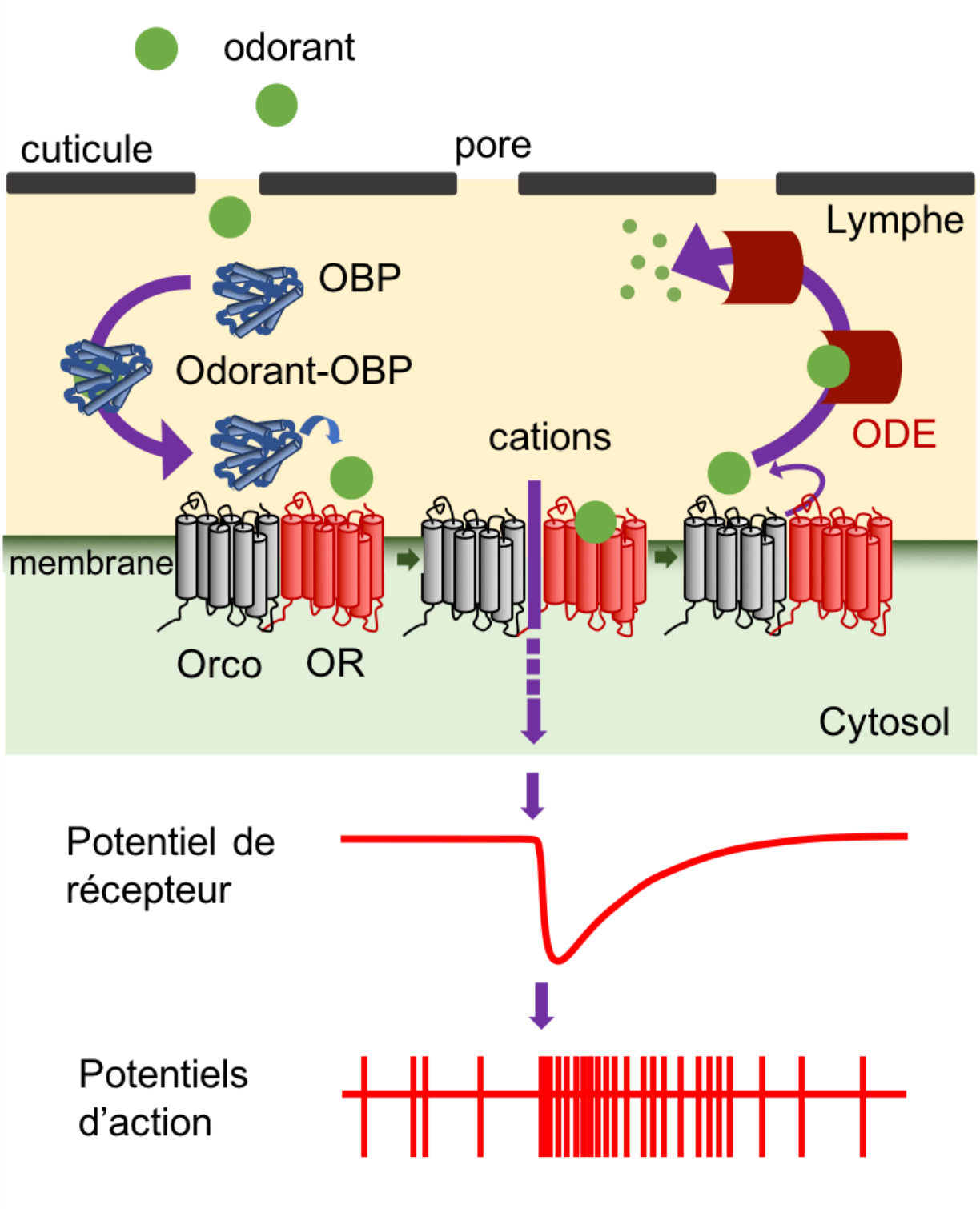


Figure 10. Processus de détection d'odeurs au niveau périphérique.
Les molécules odorantes pénètrent dans la sensille olfactive par les pores cuticulaires, ensuite elles sont prises en charge par les OBP (protéine de liaison aux odorants) elles traversent la lymphe sensillaire, et atteignent la membrane des neurones olfactifs. Dans la membrane,

l'odorant est reconnue par un complexe protéique formé par l'OR (récepteur olfactif) et le corécepteur Orco (corécepteur obligatoire). Ce complexe forme un canal ionique qui va s'ouvrir au moment de l'interaction avec la molécule odorante, en laissant entrer des cations dans le cytosol du neurone. Le message chimique est donc transformé en message électrique. La réponse est d'abord codée en amplitude (potentiel du récepteur) puis en fréquence (potentiels d'action). Si le potentiel de récepteur dépasse un certain seuil d'activation, l'axone du neurone récepteur émets des potentiels d'action qui sont transmis au cerveau. La dernière étape de ce processus implique la dégradation des molécules odorantes par l'action d'enzymes (ODE : enzyme de dégradation des odorants), pour finaliser la réponse (d'après Lucas et al., 2020).

Les CSP forment un groupe de protéines plus homogène que les OBP. Elles possèdent 40 à 50% de résidus identiques entre orthologues d'espèces phylogénétiquement distantes (Pelosi et al. 2006). Il n'existe aucune preuve expérimentale directe qui montre que les CSP sont nécessaires pour l'olfaction des insectes, ni que leur absence peut affecter la détection des phéromones et des odorants (Pelosi et al. 2018). Ces protéines sont d'ailleurs présentes dans de nombreux organes non chimiosensoriels. Il a été proposé qu'elles auraient un rôle plus large de transporteur de ligands hydrophobes non nécessairement odorants.

D'autres protéines présentes dans la lymphe sensillaire participent à la dynamique de la détection olfactive en désactivant le signal chimique une fois que le message est transmis, après interaction avec les récepteurs : il s'agit des ODE (Odorant-Degrading Enzymes) (Leal 2013). Durand et al. (2011) ont démontré que des composés volatils des plantes et des phéromones portant des fonctions ester sont inactivés par dégradation par une estérase. Les ODE appartiennent à différentes familles d'enzymes, notamment les carboxylestérases, les glutathione S-transferases (GST) et les enzymes à cytochrome P450, entre autres (Younus et al. 2014).

2.3.2 Les récepteurs membranaires

Une fois que les molécules odorantes ont atteint la membrane dendritique elles se lient éventuellement à des récepteurs chimiosensoriels, localisés dans la membrane des dendrites des OSN. Chez les insectes, ces récepteurs appartiennent à deux familles différentes : les récepteurs olfactifs (OR) et les récepteurs ionotropiques (IR) (Kaupp 2010). Les récepteurs gustatifs (GR) sont une autre famille de chimiorécepteurs qui jouent un rôle essentiel dans la perception et l'évaluation des molécules externes chez l'insecte. Cette famille sera également brièvement décrite, car elle est étroitement liée aux OR.

2.3.2.1 Les récepteurs olfactifs (OR)

2.3.2.1.1 Histoire de leur découverte

L'un des plus grands événements qui a révolutionné notre compréhension des mécanismes de l'olfaction chez les animaux a été l'identification de récepteurs olfactifs (OR) chez le rat par Buck and Axel (1991). Ces auteurs ont démontré que ces OR sont des protéines de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), qui traversent la membrane sept fois, et qui ont une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 11). Ensuite, l'identification d'OR chez le nématode *Caenorhabditis elegans* a été réalisée par Sengupta et al. (1996). Plusieurs efforts visant à identifier des récepteurs olfactifs chez les insectes, basés sur des recherches de gènes portant des similarités de séquence avec les OR identifiés chez les mammifères et *C. elegans*, ont échoué (Carlson 1996). Il a fallu attendre les premières données de séquences du génome de *Drosophila* en 1999 (10% du génome analysé à ce moment) pour que les chercheurs puissent identifier les premiers OR d'insectes. Comme la stratégie par homologie n'était pas efficace, l'idée a été de rechercher dans ces données génomiques tous les gènes codant pour des protéines à sept domaine transmembranaires par un algorithme de recherche de motifs et non pas par homologie. Puis, parmi les gènes identifiés, seul ceux exprimés dans les antennes ont été retenus comme OR potentiels, au nombre de 62. L'identification de ces premiers OR est attribué à 3 laboratoires (Gao and Chess 1999, Vosshall et al. 1999, Clyne et al. 1999) qui ont réalisé des travaux en parallèle et qui ont démontré que ces OR forment une grande famille de gènes très divergents, et qui ne présentent (comme attendu) aucune homologie avec les OR de vertébrés et de nématodes (Mombearts 1999). L'étude du patron d'expression de ces OR dans les antennes de drosophile a démontré que, comme pour les mammifères, un neurone olfactif n'exprime qu'un seul type d'OR.

Par la suite, et avec les progrès réalisés dans le séquençage de génomes complexes, l'exploitation d'autres génomes d'insectes a permis d'identifier des OR candidats chez de nombreuses autres espèces. La comparaison de leur séquence montre qu'ils sont extrêmement divergents entre espèces mais également au sein d'une même espèce, avec en moyenne 20-30% d'identité. Les OR d'insectes sont constitués de 350 à 450 acides aminés et sont, comme les OR de mammifères, des protéines à 7 domaines transmembranaires, mais leur topologie membranaire est inversée en comparaison aux GPCR, avec une extrémité N-terminale cytoplasmique et une extrémité C-terminale extracellulaire (Figure 11) (Benton et al. 2006).

Le répertoire des OR comprend 400 à 2000 membres chez les mammifères, ce qui est nettement plus important que chez les insectes, pour lesquels ce nombre varie entre 10 chez le pou (*Pediculus humanus humanus*) et 367 OR chez la fourmi *Linepithema humile* (Kirkness et al. 2010, Smith et al. 2011). Il est important de souligner que les analyses de génomes, qui définissent un nombre total d'OR pour une espèce donnée, ne donnent aucune information sur leur expression. Ainsi, selon le stade développemental, l'expérience ou l'état physiologique d'un individu, le répertoire d'OR exprimés peut être différent. Par exemple, les adultes et les larves de Lépidoptères peuvent exprimer des répertoires d'OR différents, bien qu'un certain nombre soit commun (Tanaka et al. 2009, Poivet et al. 2013, Clavijo McCormick et al. 2017, Di et al. 2017b). Chez l'anophèle,

un repas de sang modifie l'expression de certains OR (Fox et al. 2001). Une autre caractéristique qui distingue les OR des insectes et des mammifères est qu'il existe un OR hautement conservé entre espèces, appelé Orco, et qui est coexprimé avec les autres OR conventionnels dans des neurones olfactifs.

2.3.2.1.2 Le rôle du corécepteur Orco

Les premiers indices de l'existence d'un corécepteur olfactif ont été mis en évidence chez la drosophile par Vosshall et al. (1999). Ils ont nommé le gène de ce récepteur A45 et l'ont décrit comme une protéine avec 24% d'identité de séquence avec les OR classiques. Chez *D. melanogaster*, la protéine codée par A45 a été ensuite appelée OR83b (Larsson et al. 2004). OR83b est un membre atypique de la famille des OR, car il est hautement conservé chez les insectes et est exprimé dans un grand nombre d'OSN présentant différentes spécificités olfactives (Elmore et al. 2003, Dobritsa et al. 2003). Larsson et al. (2004) ont montré que la plupart des OSN co-expriment OR83b, et un (ou rarement plusieurs) OR. En utilisant des techniques d'analyses cellulaires, physiologiques et comportementales, ils ont démontré que OR83b est essentiel pour l'olfaction chez la drosophile.

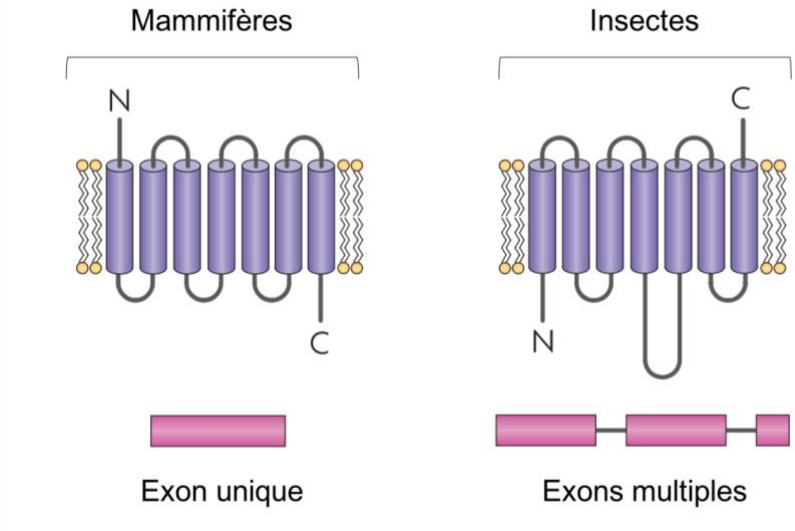


Figure 11. Topologie membranaire des OR de mammifères et des OR d'insectes et structures exon - intron de leurs gènes. Les mammifères possèdent une extrémité N-terminale extracellulaire et une C-terminal intracellulaire, contrairement aux insectes qui ont une topologie inverse à ces derniers (Adapté de Nei et al. 2008).

Les noms des orthologues de ce corécepteur étant variables selon les espèces d'insectes (*e.g.* AaOr7 pour *Aedes aegypti*, BmorOR2 pour *B. mori*, MsextaOR2 pour *M. sexta*…) (Krieger et al. 2003, Melo et al. 2004, Patch et al. 2009), un système de nomenclature unifiée a été mis en place pour ce récepteur qui a finalement été appelé « Orco » chez tous les insectes (Vosshall and Hansson 2011).

Chez *D. melanogaster*, Orco est présent dans tous les OSN localisés dans les sensilles trichoïdes et basiconiques des antennes et des palpes maxillaires, mais il n'est pas présent dans les OSN des sensilles coeloconiques, qui expriment des récepteurs n'appartenant pas à la famille des OR (Larsson et al. 2004, Stengl and Funk 2013).

Orco fonctionne en tant que protéine chaperonne assurant le transport correct du récepteur olfactif vers la membrane dendritique, tout en jouant un rôle clé dans la transduction du signal (Larsson et al. 2004, Sato et al. 2008, Wicher et al. 2008). Ceci a été vérifié dans de nombreuses études de manipulation génétique où l'inactivation de ce corécepteur a perturbé de manière significative la perception olfactive des insectes (Degennaro et al. 2013, Fandino et al. 2019). Dans notre laboratoire notamment, une étude menée sur *Spodoptera littoralis* en utilisant la technique CRISPR/Cas9 a permis de confirmer l'anosmie des individus mutants n'exprimant plus le gène Orco (Koutroumpa et al. 2016).

Butterwick et al. (2018) ont déterminé récemment pour la première fois la structure tri-dimensionnelle d'un tétramère d'Orco. Celui-ci possède une architecture originale, avec quatre sous-unités disposées symétriquement autour d'un pore central qui diverge en quatre conduits latéraux s'ouvrant sur le cytosol (voir Partie 4.1 figure 31). Le tétramère Orco présente peu d'interactions inter-sous-unités au sein de la membrane et est lié par un petit domaine d'ancrage cytoplasmique.

2.3.2.1.3 Caractéristiques fonctionnelles des OR

Ces dernières années, des analyses fonctionnelles des OR ont été réalisées chez l'insecte modèle *Drosophila melanogaster* (Hallem et al. 2004b, Hallem and Carlson 2006), le moustique *A. gambiae* (Carey et al. 2010, Wang et al. 2010) et le papillon *Spodoptera littoralis* (de Fouchier et al. 2017). En dehors de ces trois espèces, la caractérisation fonctionnelle d'OR s'est principalement limitée aux récepteurs aux phéromones des papillons de nuit (voir par exemple (Sakurai et al. 2004, Wang et al. 2011, Montagné et al. 2012a, Liu et al. 2013a, Zhang et al. 2014b).

Le nombre d'OR exprimés varie selon les espèces, et leurs spécificités est en grande partie lié à l'écologie de l'insecte. Il existe des récepteurs très spécifiques qui sont activés seulement par un groupe réduit de molécules, voire un composé particulier. Les récepteurs aux phéromones par exemple sont des récepteurs présentant un spectre de réponse très étroit, et détectent généralement un seul ou un nombre restreint de composés qui font partie du bouquet phéromonal de l'espèce considérée (Kurtovic et al. 2007, Wang et al. 2011, Liu et al. 2013a, Bastin-Héline et al. 2019). Quelques récepteurs détectant spécifiquement des composés autres que des phéromones, tels que des odorants de haute pertinence biologique, ont été également signalé chez plusieurs espèces. *Spodoptera exigua* OR3, par exemple, détecte principalement le E-β-farnesene, un composé des plantes, même à des très faibles doses (Liu et al. 2014a). Le récepteur OR31 chez *S. littoralis* est très spécifique du composé eugenol, présent dans les excréments larvaires (de Fouchier et al. 2017).

Les OR qui reconnaissent de nombreux odorants avec une large gamme de structures sont définis comme des récepteurs « à large spectre » ou généralistes (Touhara and Vosshall 2009). Ces récepteurs sont plus sensibles aux odeurs structurellement similaires (Hallem and Carlson 2006). Plusieurs récepteurs du moustique *A. gambiae* sont activés par un large panel de molécules, ces OR présentant des réponses fortes aux esters et aux aldéhydes (Carey et al. 2010). de Fouchier et al. (2017) ont démontré que SlitOR35 est un récepteur activé par plus de 15 odorants appartenant à différentes classes chimiques dont des composés aromatiques, des terpènes et des aliphatiques. Des études réalisées sur les larves de drosophiles démontrent que la plupart des OR larvaires sont largement activés principalement par des composés aromatiques et aliphatiques (Kreher et al. 2005, 2008).

Il est probable que la grande majorité des OR d'insectes sont de type généraliste. Néanmoins, un paramètre critique à l'heure de déterminer la spécificité d'un récepteur est le nombre et la sélection des odorants testés et la façon dont ce panel de molécules couvre la gamme de produits chimiques reconnus par le récepteur. Si le panel de test est trop petit et contient un ligand donné mais peu ou pas de composés chimiquement apparentés, les OR peuvent sembler à tort très spécifiques (Fleischer et al. 2018).

2.3.2.2 Les récepteurs ionotropiques (IR)

Les récepteurs ionotropiques (IR) ont été identifiés en 2009 comme une nouvelle branche de la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluR). Les IR présentent des mutations dans les domaines de liaison au glutamate (Figure 12 b) et ont donc perdu la faculté d'interaction avec le glutamate (Benton et al. 2009). Bien qu'ils ont été dans un premier temps considérés comme des récepteurs impliqués dans la détection de molécules odorantes, il a été démontré récemment que certains IR sont également impliqués dans la gustation, la détection de la température et de l'humidité (Zhang et al. 2013d, Enjin et al. 2016, Ganguly et al. 2017, Knecht et al. 2017, van Giesen and Garrity 2017). Ces récepteurs ont été surtout étudiés chez la drosophile mais ils existent chez tous les insectes, et même au-delà chez tous les protostomiens (Croset et al. 2010). Cependant, pour le moment, les études fonctionnelles en dehors de la drosophile restent rares.

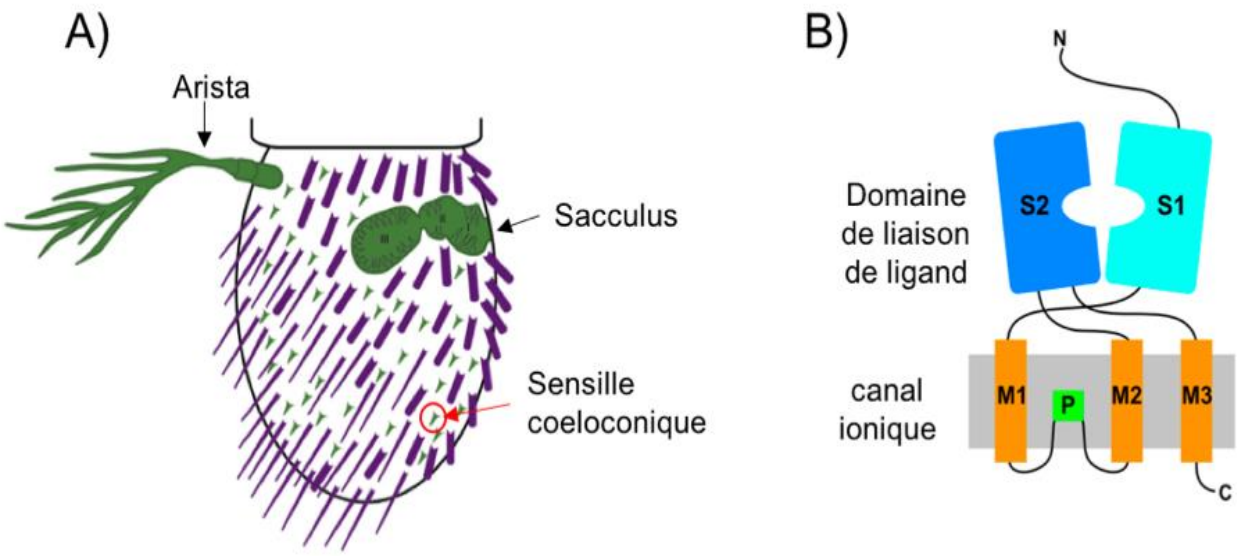


Figure 12. A : Schéma d'une antenne de drosophile mettant en évidence en vert les structures contenant des IR ; l'arista, le sacculus et les sensilles coeloconiques. **B :** Structure transmembranaire d'un IR avec un domaine de liaison de ligand et un canal ionique. (D'après Benton et al. 2009, Rytz et al. 2013) S: lobe , M: domaine membranaire, P: pore.

Suite aux études menées chez la drosophile, les IR ont été classés en 2 groupes : les IR antennaires, exprimés dans les OSN des sensilles coeloconiques ainsi que dans l'arista et le sacculus de la drosophile (Figure 12 a) et les IR divergents, exprimés dans les tissus gustatifs (Benton et al. 2009, Croset et al. 2010). Chez les lépidoptères, les IR ont été trouvés également dans les organes chimiosensoriels comme les antennes mais également dans les organes reproducteurs des mâles et femelles (Liu et al. 2018).

Les IR olfactifs forment des hétéromères avec au moins un co-récepteur (IR8a et/ou IR25a), dont les rôles sont similaires à ceux joués par Orco chez les OR (Abuin et al. 2011, Ai et al. 2013). D'autres IR sont également co-exprimés dans plusieurs neurones, notamment gustatifs (*e.g.* IR76b, IR93a), mais leur rôle comme corécepteurs ce n'est pas encore clairement établi (Benton et al. 2009, Abuin et al. 2011).

Les IR et les OR détectent différentes classes d'odeurs, ce qui augmente la capacité du système olfactif des insectes à répondre aux divers signaux de leur environnement. La plupart des neurones exprimant des IR ont une spécificité pour les molécules aliphatiques à fonction amine ou acide, alors que les OR détectent généralement les molécules aliphatiques à fonction ester ou alcool, les aromatiques et les terpénoïdes (Abuin et al. 2011, Silbering et al. 2011). Les OSN exprimant des IR sont généralement plus spécifiques, moins sensibles et s'adaptent moins rapidement que les neurones contenant des OR (Getahun et al. 2012). De plus, la plupart des neurones exprimant un OR ne contiennent qu'un seul OR avec le co-récepteur Orco. En revanche, de nombreux OSN exprimant des IR dans l'antenne de la drosophile expriment deux ou trois gènes d'IR en plus d'un ou deux corécepteurs (Benton et al. 2009).

2.3.2.3 Les récepteurs gustatifs (GR)

Les récepteurs gustatifs permettent de détecter et discriminer des substances telles que les sucres (Dahanukar et al. 2001, Slone et al. 2007), les substances amères (Weiss et al. 2011), le CO_2 (Jones et al. 2007, Kwon et al. 2007) et des phéromones de contact (Bray and Amrein 2003). Ils possèdent un pore unique terminal (Figure 13). Contrairement aux OSN, certains GRN (neurone récepteur gustatif) co-expriment de nombreux GR. Par exemple, chez la drosophile, une classe de neurones sensibles au goût amer, situés dans les palpes labiaux, exprime 29 GR différents, un neurone au goût amer situés dans les pattes coexprime 18 GR et un neurone du système gustatif larvaire coexprime 17 GR (Kwon et al. 2011, Weiss et al. 2011, Ling et al. 2014).

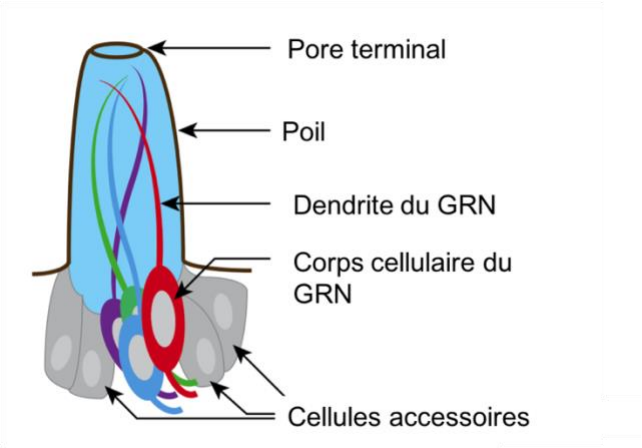


Figure 13. Morphologie d'une sensille gustative chez l'insecte. Les dendrites sont baignées dans la lymphe sensillaire (bleu clair). La paroi tige de la sensille gustative contient un seul pore, situé à son extrémité (d'après Joseph and Carlson 2015).

Les GR sont les plus anciens de tous les gènes récepteurs chimiosensoriels eumétazoaires, étant donné la présence présumée de gènes GR ou de type GR (GR-like) dans l'ancêtre commun entre les arthropodes et le phylum Placozoa (Robertson 2015, Saina et al. 2015, Benton 2015, Eyun et al. 2017).

Le nombre de gènes GR a considérablement augmenté au cours de l'évolution en raison d'événements de duplication de gènes (Sánchez-Gracia et al. 2009). L'expansion du nombre de gènes GR chez les lépidoptères est principalement le résultat d'un nombre élevé de gains de gènes et relativement peu d'événements de perte de gènes, cette expansion est potentiellement associée à l'apparition des angiospermes (Engsontia et al. 2014).

2.3.2.4 Sensory neuron membrane protein (SNMP)

Les SNMP (Sensory Neuron Membrane Proteins) sont des protéines à 2 domaines transmembranaires, et ce sont des homologues des protéines de la famille CD36 (protéines scavenger) des mammifères (Figure 14) (Rogers et al. 1997).

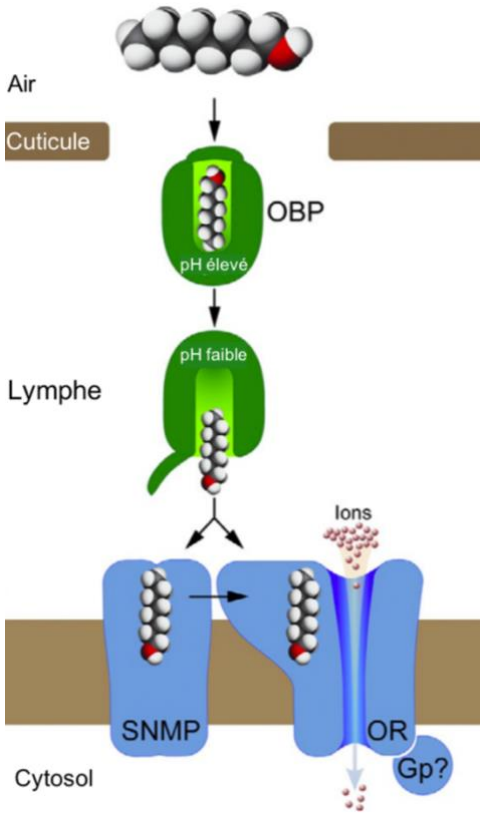


Figure 14. **Intervention des SNMP dans le processus de détection/ d'épuration des molécules odorantes** (adapté de Sparks et al. 2015).

Deux types de SNMP ont été classiquement rapportés chez les insectes, SNMP1 et SNMP2. Chez la drosophile et chez les papillons de nuit, SNMP1 est exprimée dans les neurones des sensilles trichoïdes spécialisées dans la détection de la phéromones sexuelles volatiles, mais elle est également exprimée dans d'autres organes chimiosensoriels (y compris le proboscis et les palpes maxillaires). Chez la drosophile, SNMP1 est essentielle pour la détection du cVA, phéromone volatile détectée par les sensilles trichoïdes T1, mais elle n'est pas nécessaire pour le fonctionnement des OSN des sensilles basiconiques (Benton et al. 2007, Leal 2013). SNMP2 est exprimée dans les cellules accessoires et serait impliquée dans le nettoyage de la lymphe sensillaire (Rogers et al. 1997, Forstner et al. 2008, Gu et al. 2013, Liu et al. 2014b, Zhu et al. 2016, Fleischer et al. 2017).

Une étude récente a montré qu'il existe chez les lépidoptères un troisième gène SNMP, nommé SNMP3 (Zhang et al. 2020). Celui-ci est exprimé entre autres dans l'intestin larvaire, et serait peut-être impliqué dans la réponse immunitaire aux infections virales et bactériennes (Zhang et al. 2020).

2.4 Origine et évolution des OR

Les OR et les IR ont des origines évolutives distinctes (Figure 15). Alors que les IR semblent être apparus chez l'ancêtre commun des Protostomiens (Croset et al. 2010) à partir de récepteurs au glutamate, les OR dérivent des GR (Robertson et al. 2003). Des gènes homologues des GR, appelés GR-like, ont récemment été identifiés dans les génomes de la plupart des animaux (Robertson 2015, Saina et al. 2015, Eyun et al. 2017).

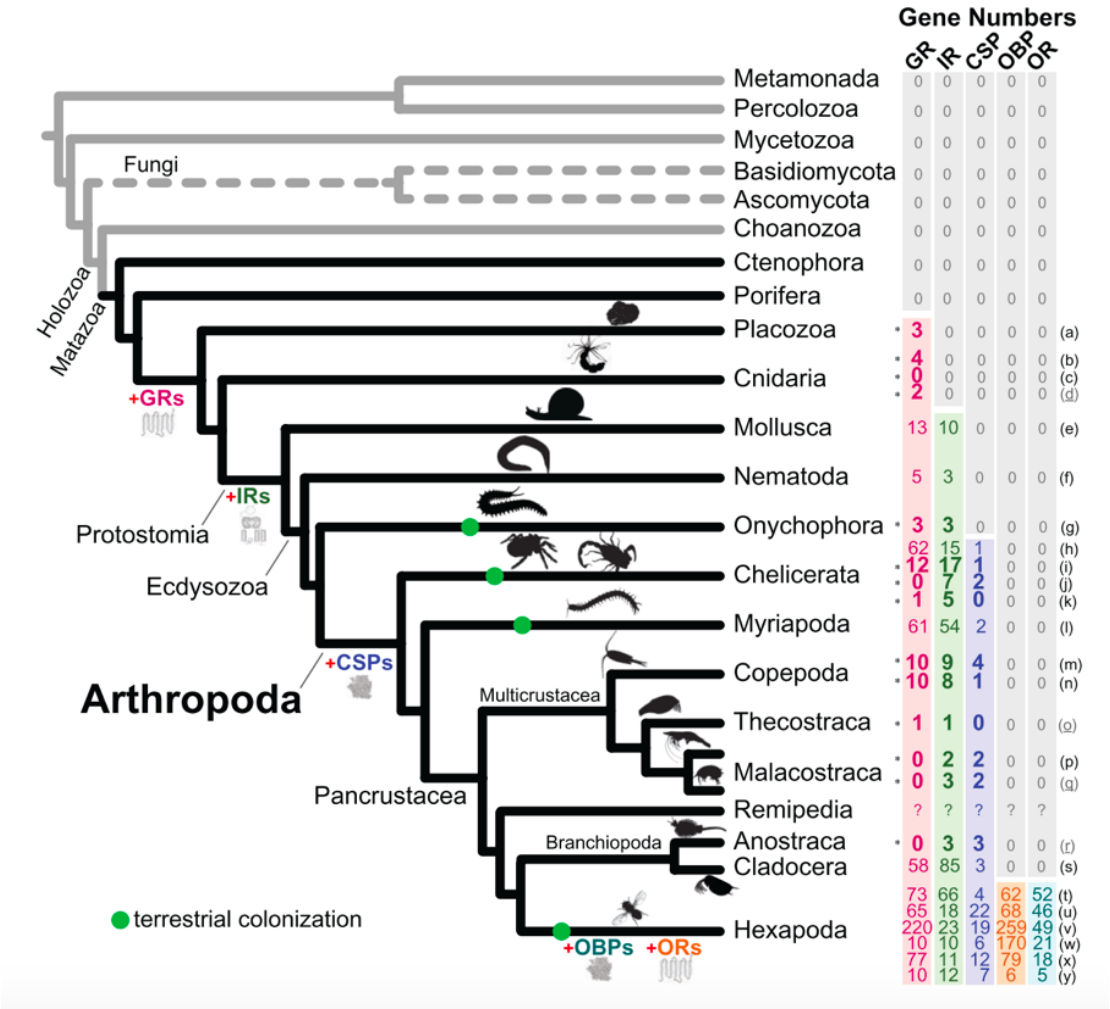


Figure 15. **Évolution des familles des gènes chimiosensoriels chez les Arthropodes** (d'après Eyun et al. 2017).

Scott et al. (2001) ont introduit la notion selon laquelle les familles de récepteurs odorants et gustatifs sont liées de façon évolutive dans une superfamille de chimiorécepteurs d'insectes. Robertson et al. (2003) ont proposé que les OR ont potentiellement évolué à partir des récepteurs gustatifs spécifiquement dans la lignée des insectes.

Missbach et al. (2014) ont suggéré que les OR ne sont pas apparus chez l'ancêtre commun des Hexapodes comme une adaptation à un mode de vie terrestre, mais auraient évolué plus tard

chez les insectes. Ils ont essayé de reconstituer un scénario évolutif pour les OR d'insectes en étudiant des espèces appartenant à différents ordres d'insectes anciens, notamment des espèces aptères : *Lepismachilis y-signata* (Archaeognatha) et *Thermobia domestica* (Zygentoma), ainsi qu'un insecte néoptère *Phyllium siccifolium* (Phasmatodea). Des analyses transcriptomiques ont montré l'absence d'OR/Orco chez *L. y-signata,* trois candidats Orco ont été identifiés pour *T. domestica* et un système bien développé d'OR/Orco a été identifié chez *P. siccifolium.* Ces résultats suggèrent que les OR auraient alors évolué uniquement chez l'ancêtre des insectes ailés (Ptérygotes) probablement lorsque les plantes vasculaires ont commencé à se diversifier et les insectes ont développé la capacité de voler.

Un autre groupe (Brand et al. 2018) a exploré cette hypothèse plus en détail, en analysant les séquences du génome de *T. domestica*, révélant ainsi l'existence d'un système OR/Orco qui n'a pas été identifié dans le transcriptome de Missbach et al. (2014). Ces gènes n'ont pas été identifiés avant car ces OR pourraient être exprimés dans des tissus ou des stades biologiques non testés, ou bien des niveaux très bas d'expression n'ont pas permis de les révéler (Brand et al. 2018). Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les OR ont évolué avec l'évolution des ailes est remise en cause (Missbach et al. 2014).

L'évolution du répertoire d'OR des insectes est décrite comme un processus continu de « naissance et de mort» (« birth and death » en anglais) dans lesquels les événements de duplication de gènes représentent les naissances, et les événements de pseudogénisation et de délétion les décès (Figure 16) (Nei and Rooney 2005, Sánchez-Gracia et al. 2009, Ramdya and Benton 2010). Conformément à ce modèle d'évolution, les répertoires de gènes d'OR ont subi de multiples expansions et rétrécissements. Selon les groupes d'insectes, différentes lignées d'OR se sont développées, tandis que d'autres se sont contractées ou ne sont tout simplement plus présentes (Andersson et al. 2015).

Ainsi le nombre d'OR varie énormément en fonction des espèces, avec 164 OR chez la blatte germanique *Blattella germanica,* environ 350 chez les fourmis *Harpegnathos saltator et Camponotus floridanus* et seulement 10 chez le pou *Pediculus humanus* (Kirkness et al. 2010, Zhou et al. 2012, Robertson et al. 2018). Chez les Lépidoptères le nombre d'OR varie de 64 chez *Danaus plexippus* à plus de 90 chez *Plutella xylostella* (Zhan et al. 2011, Dasmahapatra et al. 2012, Cheng et al. 2017, Gouin et al. 2017).

La taille de la famille de gènes d'OR chez un insecte est liée probablement à la complexité de son environnement chimique. Par exemple l'abeille *Apis mellifera* possède 163 OR en comparaison aux 62 OR chez *Drosophila melanogaster* et 79 OR chez *Anopheles gambiae* (Vosshall et al. 1999, Robertson and Wanner 2006, Carey et al. 2010). Cela peut s'expliquer par le fait que les abeilles sont confrontées à un environnement très complexe, où elles doivent être capables de percevoir plusieurs mélanges de phéromones, de signaux de reconnaissance de parenté et de diverses odeurs florales. Cela pourrait expliquer l'expansion de la famille des OR chez les Hyménoptère sociaux (Robertson and Wanner 2006).

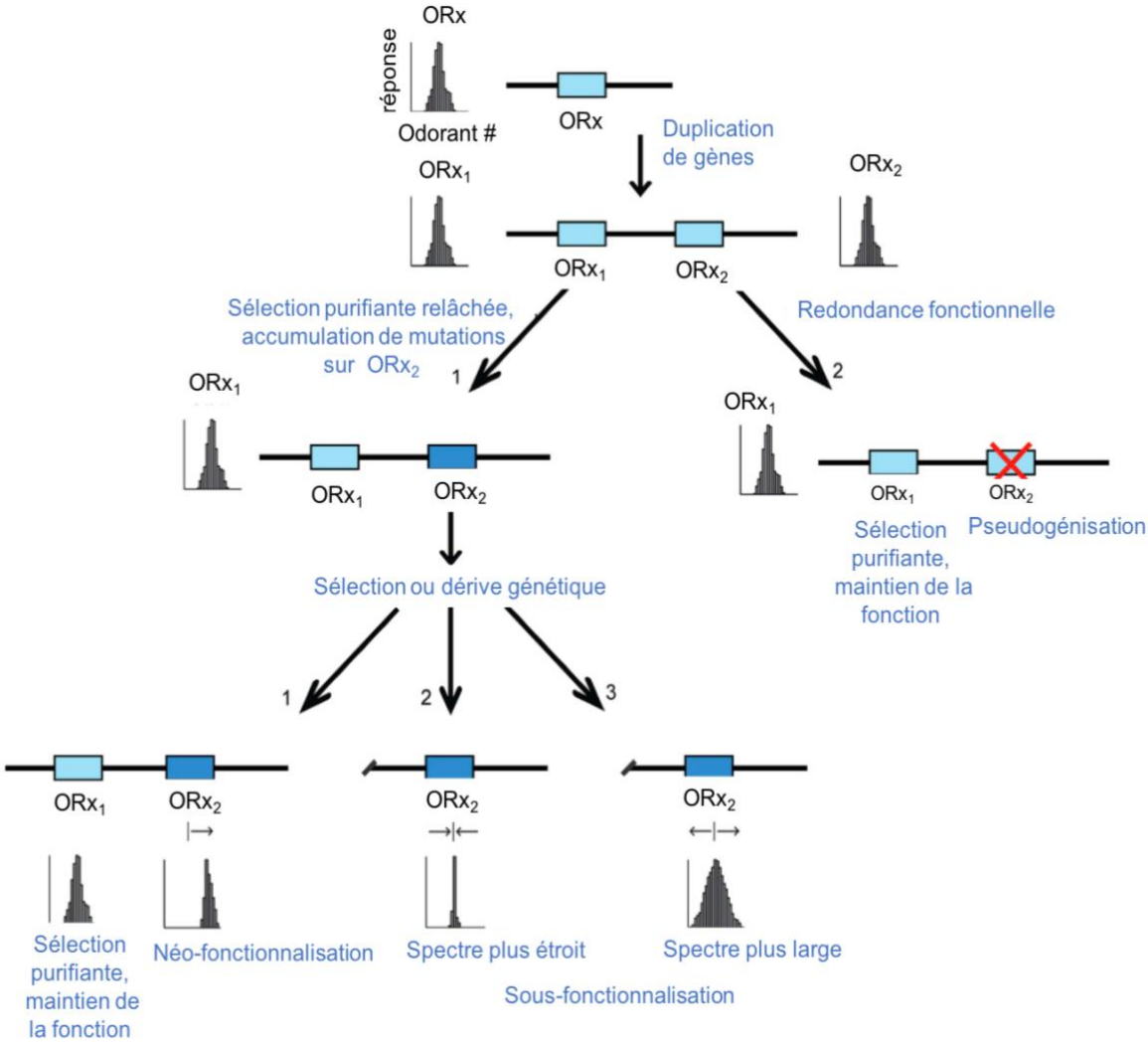


Figure 16. Le modèle d'évolution par « naissance et mort » de gènes de récepteurs olfactifs (OR). Le scénario évolutif commence par une duplication génique d'ORx donnant naissance à deux gènes OR paralogues (ORx_1 et ORx_2). Fréquemment, une des copies des gènes est pseudogénisée en raison de la redondance fonctionnelle, mais les deux peuvent également être maintenues. Dans ce dernier cas, des mutations peuvent s'accumuler sur l'un des gènes en raison d'une sélection de purification relâchée, étant donné que la fonction de l'autre récepteur reste intacte. L'OR muté pourrait acquérir une nouvelle fonction (néofonctionnalisation), ou une fonction similaire à celle de son paralogue (sous-fonctionnalisation). Le spectre de réponse peut évoluer par sélection naturelle ou par dérive génétique pour devenir plus étroit ou plus large par rapport au récepteur parental (ORx). D'après Andersson et al. (2015).

2.5 Le codage olfactif

Pour faire face au vaste espace des odeurs, les systèmes chimiosensoriels des animaux doivent nécessairement permettre de percevoir, d'identifier et d'évaluer un grand nombre de

stimuli différents. Pour mener à bien ces activités, deux hypothèses existent quant au codage des stimuli olfactifs : soit un petit nombre de récepteurs seraient capables d'interagir et de réagir à de nombreux odorants de manière combinatoire (Figure 17 A), soit un grand nombre de récepteurs interagissent chacun avec seulement quelques odorants (Figure 17 B) (Grabe and Sachse 2018).

Un codage combinatoire a été observé chez les mammifères, chez lesquels un OR est capable de reconnaître plusieurs molécules odorantes et un odorant peut être reconnu par plusieurs OR (Malnic et al. 1999). Andersson et al. (2015) suggèrent que le système chimiosensoriel des insectes est un hybride entre le codage combinatoire et les circuits spécifiques, le codage combinatoire évoluant probablement à partir de circuits dédiés. Le codage combinatoire fonctionne à la fois aux niveaux périphérique et central, avec l'activation de certains glomérules dans le lobe antennaire déclenchant un comportement particulier (Semmelhack and Wang 2009).

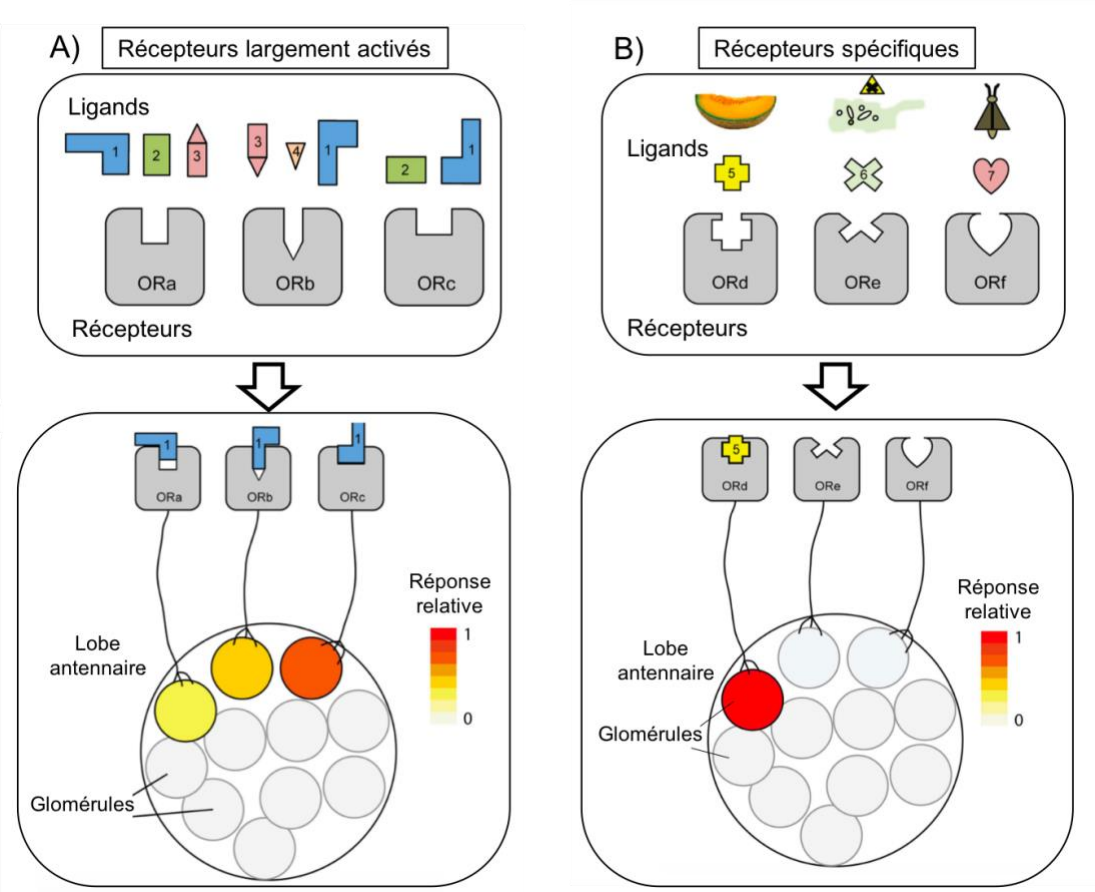


Figure 17. Le codage combinatoire. A : Récepteurs largement activés. Chaque odorant se lie à plusieurs récepteurs avec des affinités de ligand qui se chevauchent, et chaque OR est activé par plusieurs ligands. **B :** Récepteurs spécifiques pour les odorants d'importance écologique. Ils sont activés par un ou quelques odorants structurellement apparentés, et il se produit peu d'activations croisées entre les OR (adapté d'Andersson et al. 2015).

Les récepteurs détectant des composés uniques et participant à des voies neuronales spécifiques fourniraient une détection d'haute-fidélité restreignant le nombre d'odeurs pouvant être

détectées. En comparaison, un niveau de fidélité inférieur est attendu pour des récepteurs activés par plusieurs odorants, en raison des réponses qui se chevauchent (Andersson et al. 2015).

Cependant, des récepteurs détectant plusieurs molécules odorantes présentent également des avantages. D'abord, cela rend le système olfactif plus robuste en réponse aux perturbations (*e.g*. si l'expression d'un certain récepteur est empêchée ou qu'une sensille est mécaniquement endommagée, il y aurait encore d'autres récepteurs qui répondront au composé, "sauvant" ainsi potentiellement la réponse comportementale) (Fishilevich et al. 2005, Keller and Vosshall 2007). Ensuite, la détection de plusieurs composés permet une combinatoire qui augmente le nombre d'odorants et de mélanges d'odorants qui peuvent être détectés par un répertoire de récepteurs d'une taille donnée (Malnic et al. 1999, Bushdid et al. 2014). Cela augmente ainsi l'espace d'odorants perçus et permet éventuellement un certain degré de flexibilité du système olfactif et de la réponse comportementale. Plusieurs études chez les insectes ont montré que le codage temporel améliore la capacité de distinguer les odorants similaires (Stopfer et al. 1997, Friedrich and Laurent 2001, Lei et al. 2004).

Le maintien de la spécificité élevée de certains récepteurs (*e.g* récepteurs aux phéromones, certains récepteurs aux composées toxiques, ou aux composés clés pour l'oviposition) semble indispensable, car des mutations qui réduisent la spécificité réduiraient très probablement également la fidélité des canaux neuronaux correspondants, augmentant le risque, par exemple, d'erreurs d'accouplement et de ponte, ou de mort par incapacité à détecter spécifiquement les toxines (Kurtovic et al. 2007, Stensmyr et al. 2012, Dweck et al. 2013).

PARTIE III : Méthodes d'étude des OR d'insectes

Pour l'identification du répertoire de gènes chimiosensoriels et particulièrement des récepteurs olfactifs exprimés chez un insecte, des approches différentes sont utilisées. Elles seront détaillées dans cette partie, ainsi que les méthodes pour l'analyse fonctionnelle de ces récepteurs.

1 Méthodes d'identification

1.1 Approches génomiques et transcriptomiques

L'identification des différentes familles de gènes chimiosensoriels est réalisable grâce au séquençage du génome d'une espèce et/ou au séquençage du transcriptome des organes olfactifs ou gustatifs. L'analyse du transcriptome d'un tissu dans une condition donnée (stade de développement, état physiologique, temps précis du rythme circadien par exemple) permet d'identifier l'ensemble des gènes exprimés (ARN messagers) dans ce tissu et dans cette condition. Après la dissection des tissus d'intérêt et l'extraction des ARN, différentes méthodes de séquençage peuvent être appliquées dans le but d'obtenir des fragments de séquences qui doivent ensuite être assemblés pour reconstituer les séquences de tous les transcrits (Figure 18).

L'analyse du génome est plus complexe à mettre en œuvre mais permet d'identifier l'ensemble des gènes d'une espèce, y compris les gènes chimiosensoriels. Le séquençage d'un génome repose sur l'extraction de l'ADN génomique de n'importe quel tissu ou de l'animal entier, puis les méthodes de séquençage sont les mêmes que pour un transcriptome, mais l'assemblage est beaucoup plus complexe car on est souvent confronté à de l'hétérozygotie (coexistence de deux allèles différents pour un même gène) qui gêne l'assemblage. Il est ensuite nécessaire de délimiter pour chaque gène les régions exoniques et introniques pour pouvoir obtenir les séquences codantes.

1.1.1 Les méthodes de séquençage

Les technologies de séquençage Sanger et Maxam-Gilbert ont été classées comme les technologies de séquençage de première génération, avec lesquelles les tout premiers séquençages d'ADN ont été réalisés (Maxam and Gilbert 1977, Sanger et al. 1977). Les premiers génomes complets ont également été séquencés en utilisant la méthode de Sanger, par exemple ceux de *Drosophila melanogaster* ou de l'espèce humaine (Adams 2000, Lander et al. 2001).

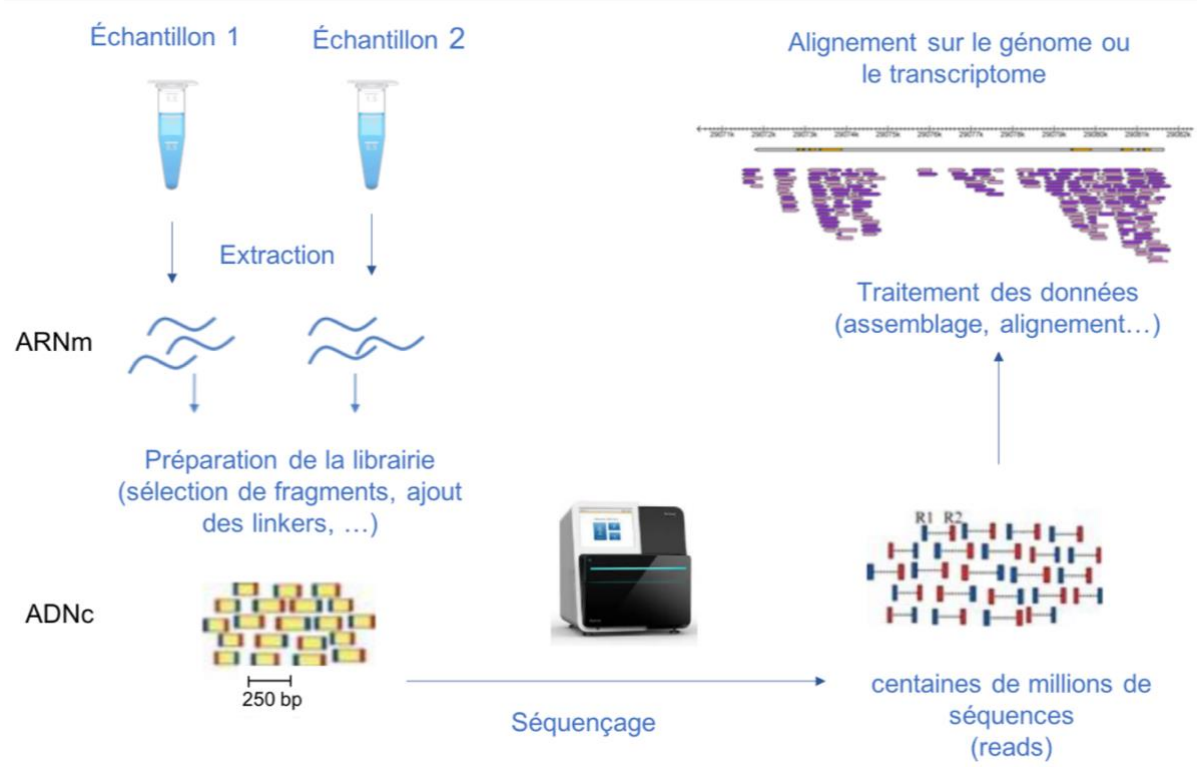


Figure 18. **Les étapes d'acquisition des données RNA-seq.** Les premières étapes sont la préparation des échantillons, extraction d'ARNm et préparation de la librairie. Ensuite la synthèse de l'ADNc, séquençage et génération des séquences ("reads"), et finalement le traitement des données.

Les technologies de séquençage de nouvelle génération ou "NGS" (Next Generation Sequencing)(Figure 19) ont fait leur apparition avec la technologie Roche/454 en 2005, puis Illumina/Solexa en 2006 et ABI/SOLiD en 2007, aujourd'hui appelés technologies de deuxième génération ou "SGS" (Second Generation Sequencing en anglais) (Metzker 2010) (Figure 20, A). Elles ont été commercialisées en tant que technologies capables de produire des séquences à haut débit et à des coûts considérablement inférieurs par rapport aux séquençages de première génération, constituant ainsi une véritable révolution dans tous les domaines de la biologie, et notamment l'étude des sens chimiques.

Les technologies de séquençage de troisième génération "TGS" (Third Generation Sequencing) (Figure 20, B) sont apparues peu après, offrant encore plus d'avantages, comme un coût de séquençage faible et une préparation plus simple des échantillons sans nécessiter d'amplification par PCR, et dans un temps d'exécution encore plus rapide que les technologies SGS. Les deux technologies de séquençage TGS les plus utilisées sont celles de Pacific Biosciences (PacBio) et du séquençage MinION de la technologie Oxford Nanopore (Mikheyev and Tin 2014, Rhoads and Au 2015).

Le principe de fonctionnement des differents méthodes de séquençage est détaillé ci-après :

1.1.1.1 Méthode Sanger

La méthode de séquençage de Sanger ou par « terminaison de chaîne » (voir figure 21) utilise des nucléotides modifiés appelés didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui peuvent être incorporés dans un brin d'ADN en cours de synthèse, mais ne permettent pas qu'un autre nucléotide soit incorporé après eux. L'allongement du brin d'ADN s'arrête donc au niveau du ddNTP incorporé, provoquant la terminaison de la synthèse de l'ADN. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel contient de multiples copies d'ADN de tailles différentes, selon l'endroit de la terminaison. Chacun des quatre types de ddNTP étant marqué différemment, il est possible de déterminer quelle base a été incorporée en dernière position lorsque le fragment d'ADN est recopié : c'est ce qui permet de déterminer la séquence complète du fragment d'ADN d'origine. Aujourd'hui cette technique reste très utilisée pour le séquençage de courts fragments d'ADN (résultats de PCR, par exemple) mais ne l'est plus pour séquencer des génomes ou des transcriptomes.

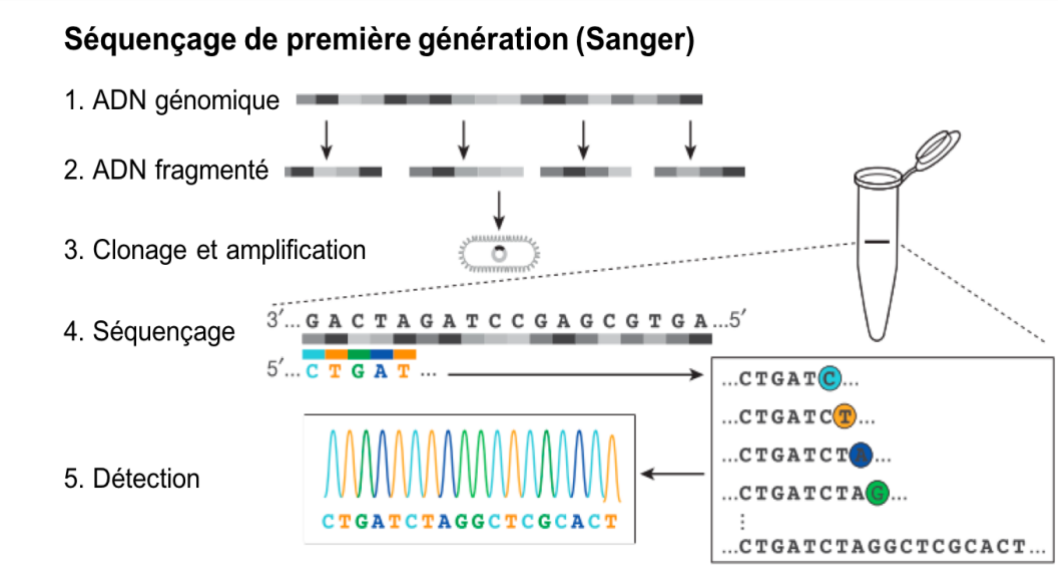


Figure 19. Méthode de séquençage Sanger (d'après Shendure et al. 2017).

1.1.1.2 Roche / 454

Cette méthode, la première dite de "nouvelle génération" à avoir été mise au point, est basée sur le principe du pyro-séquençage, c'est à dire la détection de pyrophosphate libéré après chaque incorporation d'un nucléotide dans le nouveau brin d'ADN synthétique.

1.1.1.3 Illumina/Solexa sequencing

Pour cette méthode NGS, lors de la première étape, les échantillons d'ADN sont fragmentés de manière aléatoire en séquences courtes et des adaptateurs sont liés aux deux extrémités de chaque séquence. Ensuite, ces adaptateurs sont eux-mêmes fixés à des adaptateurs complémentaires accrochés à une plaque. Au cours de la deuxième étape, chaque séquence attachée

à la plaque solide est amplifiée par « amplification de pont de PCR » qui crée plusieurs copies identiques de chaque séquence ; un ensemble de séquences créées à partir de la même séquence d'origine s'appelle un cluster. Chaque groupe contient environ un million de copies de la même séquence originale. La dernière étape consiste à déterminer la séquence de nucléotides, grâce à une technique de séquençage par synthèse qui utilise des nucléotides marqués et des terminateurs réversibles. Illumina est actuellement la technologie NGS la plus utilisée.

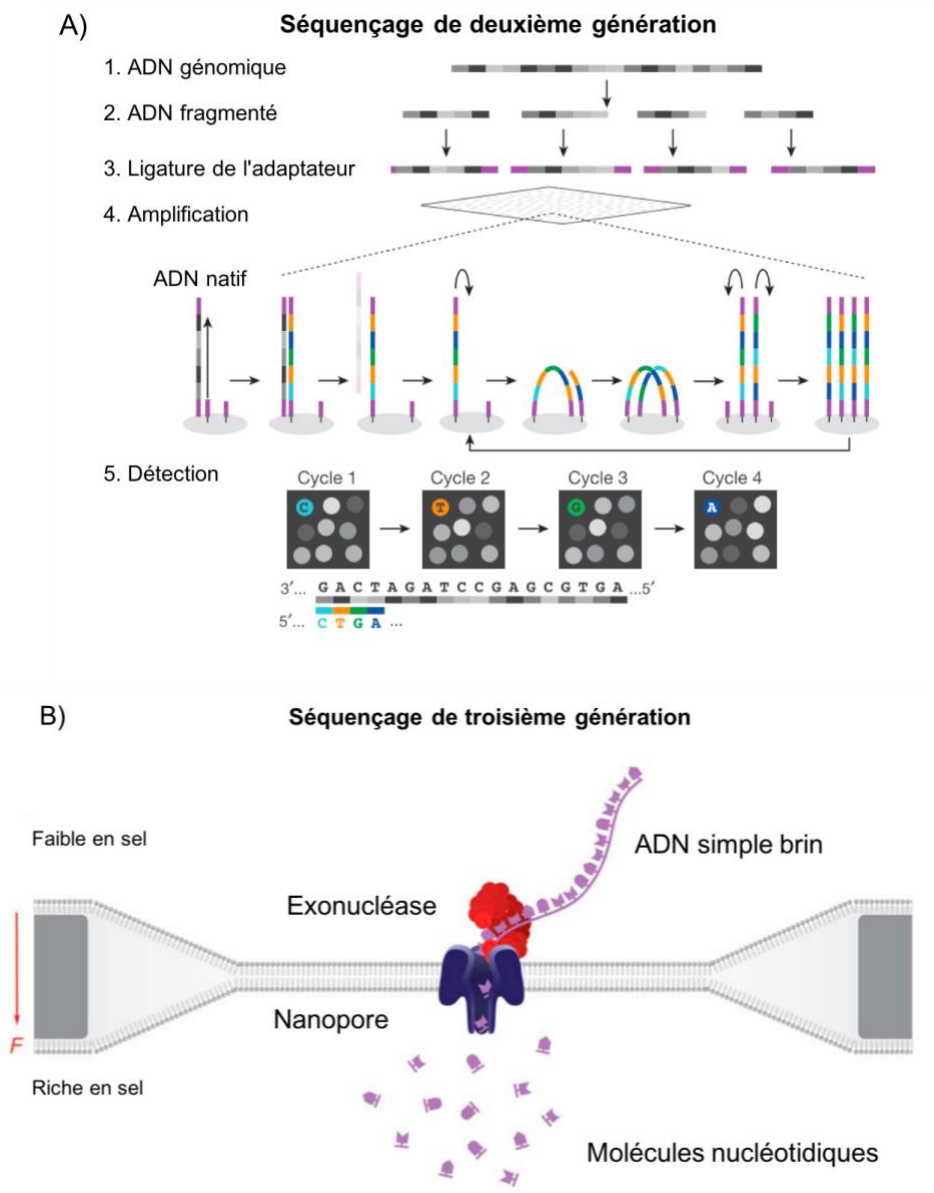


Figure 20. Technologies de séquençage de deuxième et troisième génération. A : Illumina: L'ADN se fixe à la cellule via des séquences complémentaires. Le brin s'attache à un deuxième oligo formant un pont. Une polymérase synthétise le brin inverse. Les deux brins se libèrent et se redressent. Chacun forme un nouveau pont (amplification en pont). Le résultat est un cluster de clones de brins d'ADN (forward et reverse). **B :** Technologie Oxford Nanopore pour mesurer la translocation des nucléotides clivés d'une molécule d'ADN à travers un pore, entraînée par la

force des concentrations différentielles d'ions à travers la membrane. (D'après Schadt et al. 2010, Shendure et al. 2017).

1.2 Bioinformatique, identification et quantification des gènes chimiosensoriels dans un transcriptome

La bioinformatique est l'ensemble des outils informatiques utilisés pour le stockage, le traitement et l'analyse de données biologiques. Il existe une très grande diversité d'outils et seuls quelques exemples seront donnés ci-dessous, pour illustrer le cas où l'on s'intéresse à une espèce sans données génomiques disponibles. Si l'on ne souhaite pas se lancer dans le séquençage du génome, l'approche transcriptomique est appropriée (RNAseq). Les étapes nécessaires à l'identification des gènes chimiosensoriels sont alors les suivantes (figure 21) :

-Préparation des tissus cibles et extraction de l'ARN (organes chimiosensoriels si l'on cherche les gènes chimiosensoriels)
-Préparation de librairies et séquençage RNAseq
-Nettoyage des séquences (retrait des adaptateurs de séquençage, de séquences contaminantes, de séquences ribosomiques, etc)
-Assemblage des lectures en contigs (assemblage *de novo*)
-Recherche par homologie
-Annotation

Par ailleurs, il est possible de quantifier l'expression des transcrits et étudier ainsi leur expression différentielle selon différentes conditions. C'est l'approche RNAseq. La manipulation des données de séquençage haut-débit par les biologistes est aujourd'hui grandement facilitée par des logiciels sous licence ou des plateformes publiques qui simplifient l'utilisation des outils. Ainsi, Galaxy est une plateforme web ouverte qui a pour objectif de rendre la bioinformatique accessible aux chercheurs n'ayant pas de compétence en programmation informatique (Goecks et al. 2010). Cette plateforme permet de réaliser toutes les étapes de nettoyage, d'assemblage, de recherche ou de quantification.

Une fois les librairies séquencées, les outils les plus couramment utilisés pour le nettoyage, l'assemblage et l'analyse d'un transcriptome *de novo* sont détaillés ci-dessous :

1.2.1 Outils de nettoyage pré-assemblage

Avant l'assemblage, il faut d'abord passer plusieurs étapes de nettoyage et d'analyse des transcrits, ces étapes sont détaillées ci-dessous avec des exemples d'outils disponibles dans Galaxy:
- FastQC réalise un contrôle de qualité sur les séquences brutes, en analysant la distribution de la qualité de base, les fréquences de *k*-mer (oligonucléotide court de longueur *k*) et les contaminations. C'est une première étape importante pour comprendre la qualité des données.
- FastQGroomer permet de convertir différents formats de qualité FASTQ (Blankenberg et al. 2010).

- Trimmomatic scanne les bases de faible qualité à partir de fichiers FASTQ et supprime les bases de qualité inférieure à un seuil donné (Bolger et al. 2014).
- Ribopicker permet l'identification et la suppression des séquences de type ARN ribosomique (Schmieder et al. 2012). Le transcriptome des chenilles est un RNA-seq « paired-end », j'ai donc gardé uniquement les données appariées issus de Ribopicker.

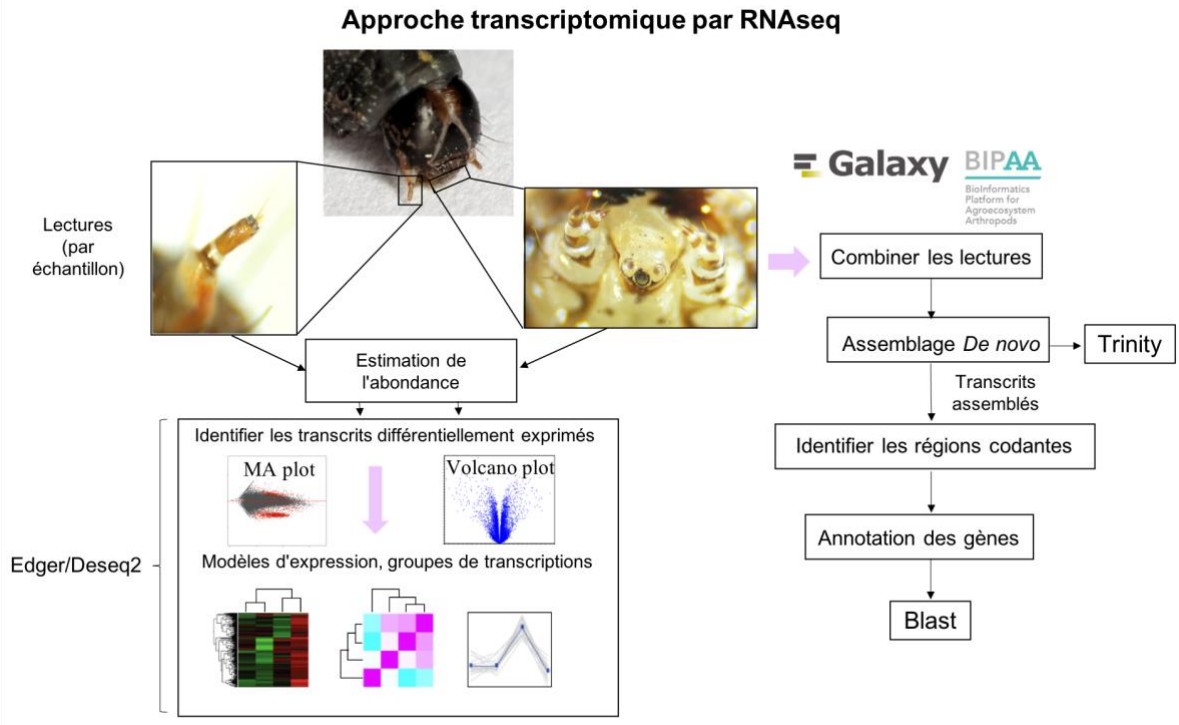


Figure 21. Assemblage de transcriptome *de novo* et workflow d'analyse. Les lectures à partir de plusieurs échantillons (par exemple, différents tissus) sont combinées en un seul ensemble de données. L'ensemble des lectures combinées est assemblé par Trinity pour générer un assemblage de transcriptome *de novo* « de référence » (à droite). Les régions codantes pour les protéines peuvent être extraites de l'assemblage de référence à l'aide de TransDecoder. Parallèlement à cette annotation, l'analyse d'expression est effectuée en alignant les lectures de chaque échantillon sur l'assemblage du transcriptome de référence, suivie d'une estimation de l'abondance de chaque transcrit à l'aide de RSEM. Les transcrits exprimés différentiellement entre échantillons sont identifiés en appliquant les outils edgeR et deseq2 à une matrice contenant les estimations d'abondance RSEM (adapté de Haas et al. 2013).

1.2.2 Outils d'assemblage d'un transcriptome

La stratégie d'assemblage du transcriptome *de novo* n'utilise pas de génome de référence, elle exploite la redondance du séquençage à lecture courte pour trouver des chevauchements entre les lectures et les assembler en transcrits (Martin and Wang 2011). Même si un génome de référence est disponible, il est toujours recommandé de compléter une étude d'expression génique par un assemblage de transcriptome *de novo* pour identifier les transcrits qui n'ont pas été repérés par le

processus d'assemblage du génome ou qui ne sont tout simplement correctement annotés (Martin and Wang 2011).

Si l'on possède plusieurs jeux de données RNAseq (par exemple dans le cas où l'on a prévu une étude d'expression différentielle nécessitant des répétitions, voir ci-dessous), il est recommandé de les combiner dans un seul ensemble de données pour générer un seul assemblage. Ce transcriptome sera ainsi le plus complet possible, et pourra servir de référence pour l'analyse d'expression différentielle (Haas et al. 2013). Un modèle simplifié d'assemblage et d'analyse d'expression différentielle est présenté dans la figure 21.

Le principal outil utilisé pour l'assemblage du transcriptome *de novo* à partir des données RNA-seq est Trinity**.** Cet outil combine trois modules logiciels indépendants : *Inchworm*, *Chrysalis* et *Butterfly* (Figure 22), appliqués séquentiellement pour traiter de grands volumes de lectures de RNA-seq (Grabherr et al. 2011). *Inchworm* utilise une approche basée sur *k*-mer pour un assemblage de transcription rapide et efficace, ne récupérant qu'un seul (meilleur) représentant pour un ensemble de variantes alternatives (Figure 22a). Ensuite, *Chrysalis* regroupe les contigs associés qui correspondent à des portions de transcrits épissés alternativement ou à des portions autrement uniques de gènes paralogues. *Chrysalis* construit ensuite un graphique de De Bruijn pour chaque groupe de contigs associés (Figure 22 b). Un graphique de De Bruijn est un graphique mathématique dirigé qui utilise une séquence de lettres de longueur k pour représenter les nœuds. Des paires de nœuds sont connectées si le décalage d'une séquence d'un caractère crée un chevauchement k – 1 exact entre les deux séquences. *Butterfly* reconstruit des transcrits linéaires vraisemblables et complets en intégrant les graphiques individuels de De Bruijn générés par *Chrysalis* avec les lectures originales et les extrémités appariées (Figure 22 c).

Les paramètres utilisés pour Trinity dépendent d'un certain nombre de facteurs, y compris la stratégie de séquençage et la taille de l'ensemble de données.

Après l'assemblage avec Trinity, d'autres outils peuvent être utilisés pour s'assurer de la qualité de l'assemblage et pour conserver uniquement les données plus pertinentes :

1.2.3 Validation de la qualité du transcriptome généré

- CD-HIT-EST : cet outil réduit la taille globale de la base de données sans supprimer d'information de séquence mais en supprimant uniquement les séquences « redondantes » (ou très similaires) (Fu et al. 2012).

- TransDecoder : cet outil identifie les régions codantes candidates dans les transcrits (Haas et al. 2013).

- BUSCO (« Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs ») : outil d'évaluation pour estimer l'exhaustivité des transcriptomes. Dans l'analyse BUSCO, l'outil utilise des profils de modèles de Markov pour rechercher un ensemble défini de gènes connus, conservés et présents en copie unique dans les génomes ou transcriptomes. La qualité du transcriptome généré est alors évaluée en

déterminant le nombre de BUSCO complets et présents en copie unique, le nombre de BUSCO dupliqués et le nombre de BUSCO absents (Simão et al. 2015).

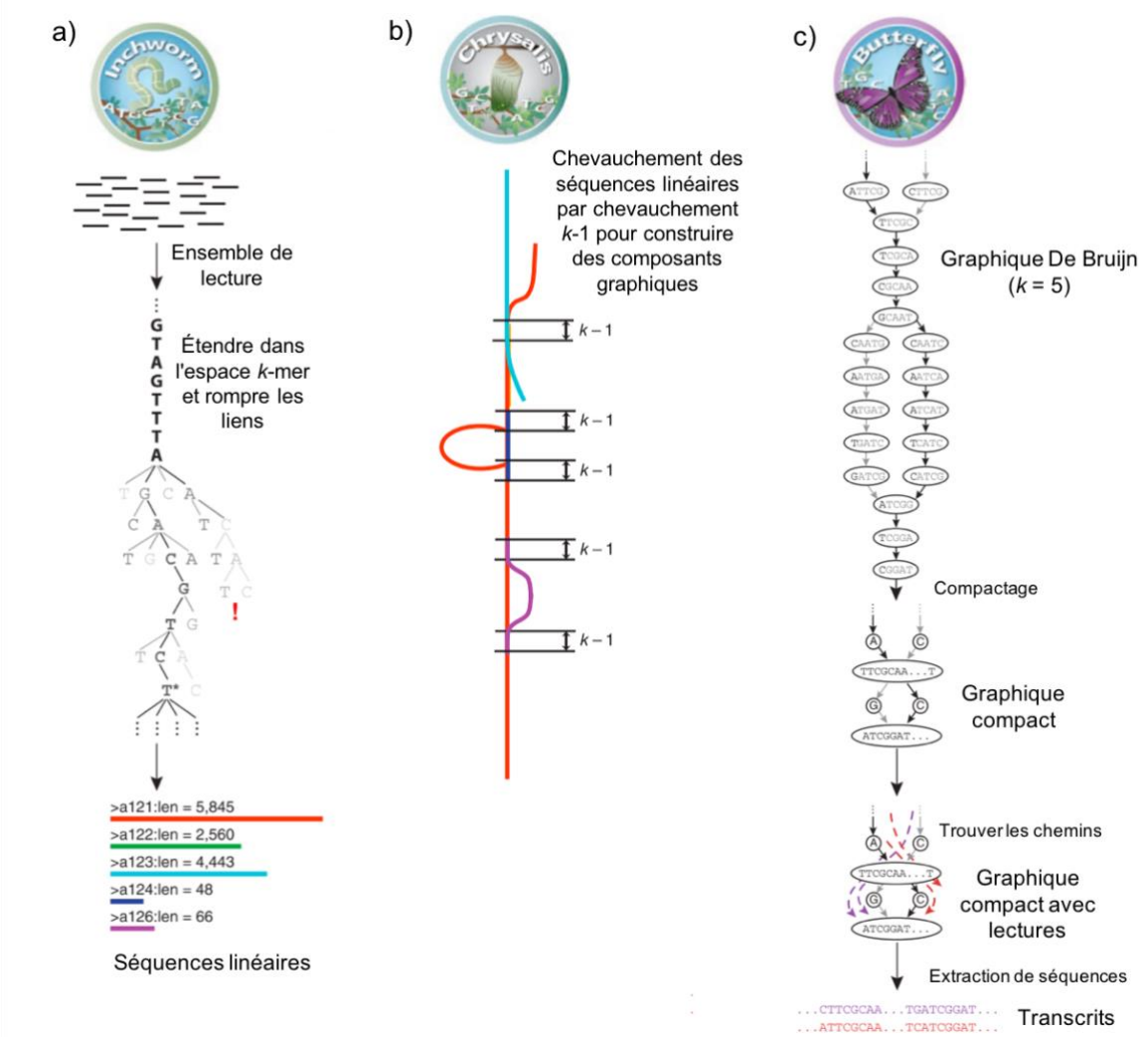


Figure 22. Vue d'ensemble de Trinity. (a) *Inchworm* assemble l'ensemble de données lues (lignes noires, en haut) en recherchant avidement les chemins dans un graphique *k*-mer (milieu), résultant en une collection de contigs linéaires (lignes de couleur, en bas), avec chaque *k*-mer présent qu'une seule fois dans les contigs. **(b)** *Chrysalis* rassemble des contigs (lignes colorées) s'ils partagent au moins un *k* - 1-mer et si les lectures couvrent la jonction entre les contigs, puis il construit des graphiques de De Bruijn individuels à partir de chaque pool. **(c)** *Butterfly* prend chaque graphique de De Bruijn de *Chrysalis*, coupe les bords parasites et compacte les trajectoires linéaires (au milieu). Il réconcilie ensuite le graphique avec les lectures (flèches colorées en pointillés) et les paires (non illustrées), et génère une séquence linéaire pour chaque forme d'épissage et/ou transcription paralogue représentée dans le graphique (en bas, séquences colorées) (d'après Grabherr et al. 2011).

1.2.4 Annotation de gènes

Il est d'abord nécessaire de réaliser une annotation structurale du transcriptome, c'est à dire identifier les transcrits codant pour des protéines (*i.e.* ayant des régions codantes, exemple d'outil : Transdecoder). Ensuite, l'annotation fonctionnelle va consister à donner une potentielle fonction à ces protéines par comparaison de séquence avec des protéines de rôle connu. L'outils par excellence est BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul et al. 1990) (Altschul et al. 1990)qui permet de comparer des séquences nucléotidiques ou protéiques à des bases de données publiques mondiales, comme GenBank (ressource publique du NIH) ou UniProt « Universal protein Resource » (The Uniprot consortium 2009)(Apweiler et al. 2009), respectivement.

L'outils BLAST peut être utilisé de deux façon pour rechercher dans un transcriptome une famille de protéines en particulier, comme par exemple les protéines chimiosensoriels:

-soit le transcriptome est annoté fonctionnellement en totalité sans *a priori* par BLAST de tous les transcrits sur les banques de données, puis l'on y recherche les protéines d'intérêt,

-soit on cherche dans la bibliographie ou dans les banques de données des protéines déjà annotées chez des organismes proches (insectes par exemple), puis on les utilise pour rechercher des homologues dans le transcriptome par BLAST. Cette deuxième approche est souvent plus efficace pour rechercher des familles de protéines divergentes, comme par exemple les OR d'insectes.

1.2.5 Analyse d'expression différentielle

L'expression des gènes est généralement régulée différemment par exemple en fonction des organes (*e.g.* cerveau contre rein), du stade de développement (*e.g.* tissu fœtal contre tissu adulte), de la réponse dynamique aux signaux environnementaux, des états pathologiques, ou de l'activité des gènes (*e.g.* bactérie mutante vs sauvage) (Pevsner 2015). Les approches RNAseq permettent de mettre en évidence de telles différences d'expression de transcrits entre les différentes conditions (expression différentielle). Le principe repose sur la préparation de librairies dans les conditions définies et leur séquençage en grande profondeur. Ainsi, plusieurs millions de reads sont obtenus par échantillon. Pour chaque échantillon, les reads sont ensuite alignés sur une référence (qui peut être soit un transcriptome assemblé, soit un génome) et comptés. On peut estimer ainsi le niveau d'expression d'un gène par l'abondance de reads qui le représentent, et comparer ce niveau d'expression entre échantillon. Cette approche nécessite :

- Une normalisation des échantillons pour les rendre comparables
- Des répétitions pour une analyse statistique des résultats

Là aussi il existe une diversité d'outils bioinformatiques pour réaliser une telle analyse, dont les plus classiques sont :

-pour l'alignement et le comptage des reads: Bowtie, RSEM (Langmead 2010, Li and Dewey 2011).

-pour l'analyse statistique : DESeq2 (Love et al. 2014) et edgeR (Robinson et al. 2010, Liu et al. 2015).

Outils d'expression differentiel:

Deseq2 est une méthode d'analyse différentielle des données de comptage, utilisant l'estimation du retrait ou « shrinkage estimators » pour les dispersions et les « fold change » afin d'améliorer la stabilité et l'interprétabilité des estimations. Deseq2 présente une sensibilité et une précision élevées, tout en contrôlant le taux de faux positifs (Love et al., 2014).

Edger examine l'expression différentielle des données de comptage répliquées. Le logiciel est conçu pour trouver des changements entre deux ou plusieurs groupes quand au moins un des groupes possède des réplicas. Des analyses statistiques combinant la régression de Poisson et le théorème de Bayes sont appliqués dans cet outil (Robinson et al., 2010).

L'approche de Deseq2 diffère de celle de Edger, car Deseq2 estime la largeur de la distribution à partir des données et contrôle donc automatiquement la quantité de retrait en fonction des propriétés observées des données. En revanche, les étapes par défaut dans Edger nécessitent un paramètre réglable par l'utilisateur, les degrés de liberté pèsent la contribution de l'estimation du gène individuel et de l'ajustement de la dispersion de Edger (Love et al., 2014).

2 Analyse fonctionnelle : comment identifie-t-on les ligands des OR ?

Les récepteurs pour lesquels les ligands sont inconnus sont dits « orphelins ». Le processus de recherche de molécules qui activent ces récepteurs est donc ce qu'on appelle la « déorphanisation ». Bien que différentes techniques aient été développées pour déorphaniser les OR des insectes, il est important de souligner que seule une infime partie de ces OR a pu être fonctionnellement caractérisée à ce jour. Et cela n'est pas spécifique aux insectes, il en est de même pour les OR de mammifères dont ceux de l'homme. Dans la figure 23 sont présentées les méthodes les plus utilisées pour la déorphanisation des OR d'insectes.

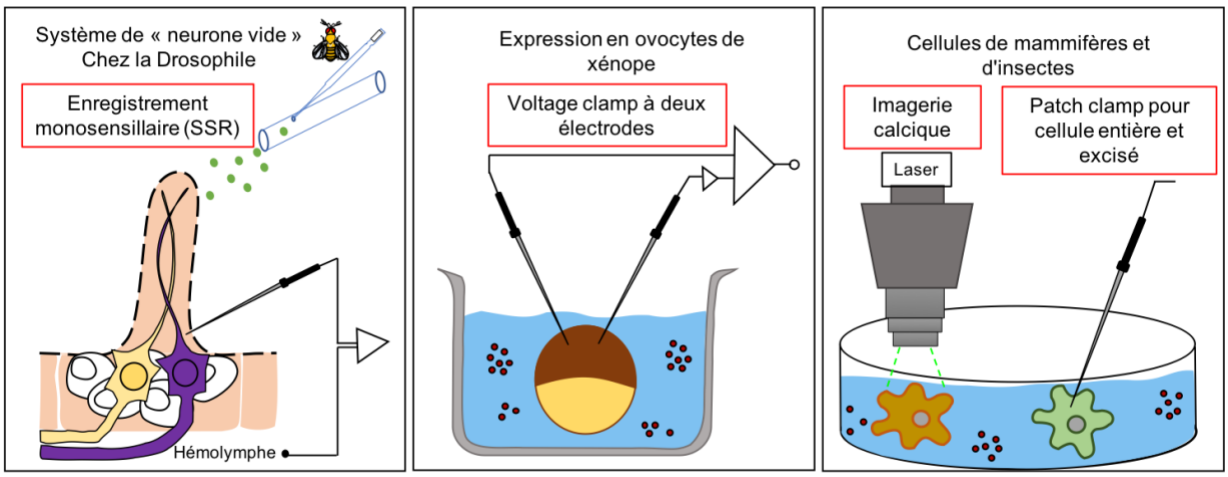


Figure 23. Différents systèmes d'expression pour la caractérisation fonctionnelle d'OR. A gauche : Système d'expression en neurone vide chez la drosophile, couplé à l'enregistrement monosensillaire. **Au centre :** Expression en ovocytes de xénope couplée au "Two electrode voltage clamp". **A droite :** Expression hétérologue en cellules de mammifère ou d'insecte couplée à l'imagerie calcique ou au patch-clamp.

2.1 Méthodes i*n vivo*

2.1.1 Système d'expression en neurone vide

Dans notre laboratoire la caractérisation fonctionnelle de plus de 30 OR de la noctuelle *Spodoptera littoralis* a été réalisée en utilisant le système de « neurone vide » chez la drosophile couplée à la technique d'électrophysiologie d'enregistrement monosensillaire (SSR ou « Single Sensillum Recording » en anglais). Cette méthode a été établie à l'université de Yale, dans le laboratoire de John R. Carlson (Dobritsa et al. 2003). Le principe est de remplacer le récepteur DmelOR22a, exprimé dans un OSN des sensilles basiconiques ab3 par l'OR à déorphaniser, puis d'enregistrer le spectre de réponse de ce neurone modifié en le stimulant avec différentes molécules odorantes (Figure 24).

Pour cela, il faut réaliser des croisements entre deux lignées de drosophiles présentant plusieurs modifications génétiques :

1) *w*; *Δhalo*; *DmelOr22a-Gal4*
Cette lignée possède une délétion (appelée *Δhalo*) d'une région génomique contenant le gène *DmelOr22a*. Elle possède également une construction génétique permettant d'exprimer le facteur de transcription GAL4, dérivé de levure, sous le contrôle du promoteur du gène *DmelOr22a*.

2) *w*; *Δhalo*; *UAS-Or*
Cette lignée (qui doit être générée au laboratoire pour chaque nouvel OR à étudier) possède également la délétion *Δhalo* ainsi qu'une construction contenant la séquence codante de l'OR candidat placée en aval de la séquence promotrice *UAS* (Upstream Activation Sequence en anglais) qui est activée spécifiquement par la protéine GAL4 (Brand and Perrimon 1993).
Lorsque ces deux lignées de mouches sont croisées, la protéine GAL4 se lie à la séquence *UAS* et active la transcription du gène codant l'OR candidat, et ce uniquement dans les neurones "vides" qui expriment normalement *DmelOr22a* (Gonzalez et al. 2016).

2.1.2 Système «Knock-in *Or67d*^{GAL4} » pour expression des PRs

Une autre technique très similaire permet l'expression d'OR exogènes dans les sensilles trichoïdes. Elle est utilisée pour l'expression hétérologue des récepteurs aux phéromones car ces sensilles expriment SNMP1, qui serait nécessaire pour la fonction des récepteurs aux phéromones. Cette méthode est celle du système « Knock-in *Or67d*^{GAL4} ». Dans ce système, la séquence codante du récepteur OR67d, qui est responsable de la détection de la phéromone cVA dans les OSN des sensilles at1, est remplacée par la séquence codante du facteur de transcription GAL4 (Kurtovic et al. 2007). Pour obtenir une lignée exprimant constitutivement un OR d'intérêt à la place d'OR67d, il faut ensuite croiser la lignée possédant cette construction *Or67d*^{GAL4} avec une lignée contenant la séquence codante de l'OR en aval de la séquence *UAS* (Gonzalez et al. 2016). Les systèmes du neurone vide et knock-in *Or67d*^{GAL4} ont été largement utilisés pour déophaniser des récepteurs

phéromonaux de plusieurs espèces d'insectes (Montagné et al. 2012, de Fouchier et al. 2015, Cattaneo et al. 2017).

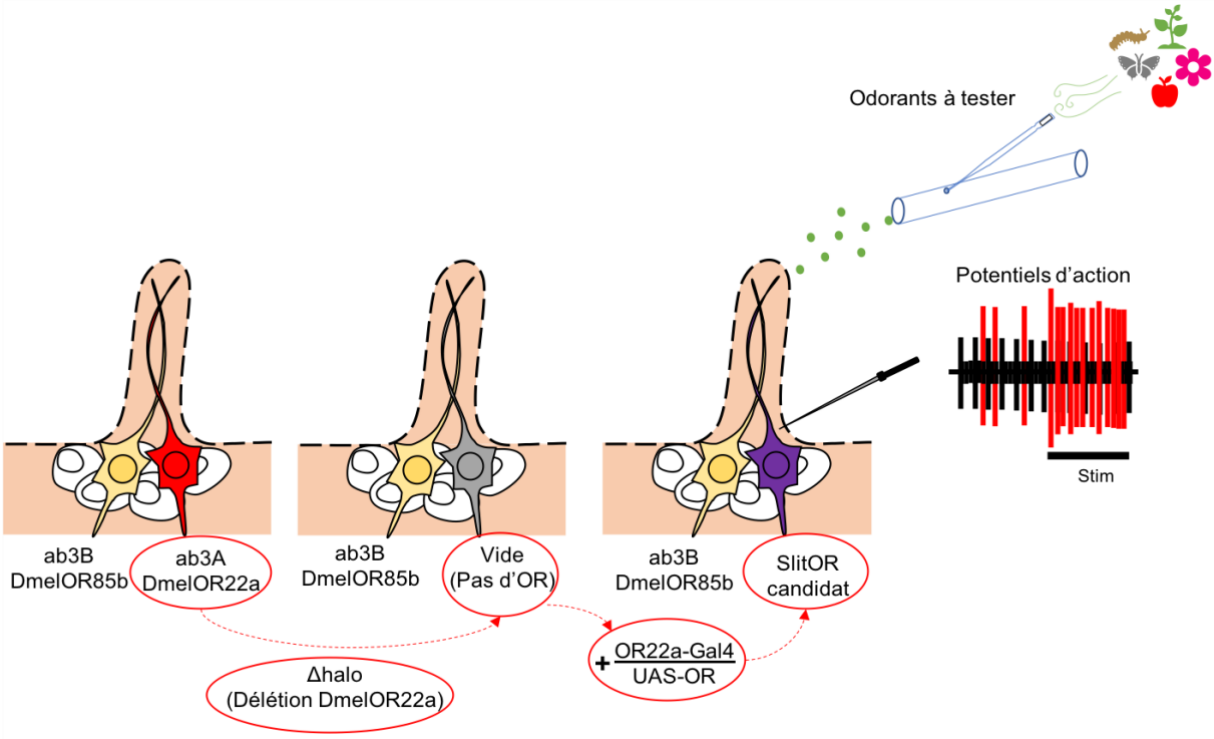


Figure 24. Système d'expression en « neurone vide » chez la drosophile. Sur cette figure on observe les sensilles ab3 qui possèdent 2 OSN. L'OSN ab3A exprime DmelOR22a et l'OSN ab3B exprime DmelOR85b. Les drosophiles homozygotes pour la délétion *Δhalo* ne possèdent plus le gène codant DmelOR22a. Par conséquent, le neurone ab3A dans ces mouches est « vide ». Il est donc possible d'exprimer un OR candidat à la place de DmelOR22a en utilisant la protéine GAL4 - qui sert d'activateur de transcription dans ce système - sous le contrôle du promoteur de DmelOR22a. En utilisant la technique d'enregistrement mono-sensillaire (SSR) on peut tester un panel d'odorants sur les sensilles ab3 et enregistrer la réponse obtenue sous forme de potentiels d'actions.

2.1.3 Nouveau système de neurone vide

Récemment un nouveau système de neurone vide a été mis en place en utilisant la technique d'édition de gènes CRISPR-Cas9 pour insérer une séquence GAL4 directement dans le locus DmelOrR22a (Chahda et al. 2019) (Figure 25). Cette insertion peut être facilement maintenue dans les individus homozygotes, sans subir la viabilité réduite de la lignée possédant la délétion *Δhalo* présentée ci-dessus.

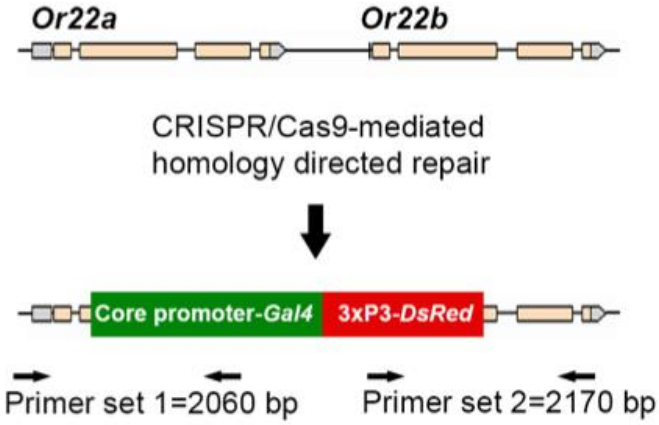


Figure 25. knock-in par CRISPR/Cas9 du gène du facteur de transcription Gal4 dans les régions codantes de Or22a et Or22b. La région génomique avant (haut) et après recombinaison homologue médiée par CRISPR/Cas9, permettant l'insertion du facteur de transcription Gal4 et du gène codant pour la protéine fluorescente DsRed sous le contrôle d'un promoteur oculaire 3xP3s (bas)(d'après Chahda et al. 2019).

Ces systèmes *in vivo* chez la drosophile ont l'avantage d'exprimer les OR dans un contexte neuronal. De plus, les stimulations se font au moyen d'un flux d'air odorisé, alors que dans les systèmes *in vitro* la stimulation se fait par perfusion, dans des conditions très éloignées de la réalité de l'insecte (de Fouchier et al. 2014, Wang et al. 2016). Cependant, l'utilisation des systèmes *in vivo* en drosophile présente également certains inconvénients, tels que le temps pour obtenir les mouches avec le génotype sélectionné (plusieurs mois) et le coût de chaque lignée. Par conséquent, ces systèmes ne sont pas les plus adaptés pour le test de criblage d'un très grand nombre d'OR.

2.2 Méthodes i*n vitro*

En ce qui concerne l'expression hétérologue *in vitro* pour tester les OR des insectes, il existe différents systèmes cellulaires utilisables.

2.2.1 Lignées cellulaires

Les cellules HEK293 (cellules rénales embryonnaires humaines ou « Human embryonic kidney cells » en anglais) ont été utilisées pour déorphaniser quelques OR de Lépidoptères comme *Bombyx mori*, *Antheraea polyphemus*, *Epiphyas postvittana* et *Lampronia capitella* (Große-Wilde et al. 2006, Forstner et al. 2009, Corcoran et al. 2014, Yuvaraj et al. 2018). Une autre lignée cellulaire sont les cellules Sf9 provenant du tissu ovarien du papillon de nuit *Spodoptera frugiperda* et qui représentent donc un choix pertinent pour exprimer les OR des lépidoptères, puisque les cellules Sf9 expriment déjà le corécepteur Orco de l'insecte (Kiely et al. 2007, Smart et al. 2008). Ce système d'expression d'OR a été testé pour des OR de drosophile et également du lépidoptère *Epiphyas postvittana* pour lequel 3 OR ont été caractérisés.

D'autres cellules d'insectes telles que les cellules S2 de *Drosophila melanogaster* (Dmel2 cells), Bm5 de *Bombyx mori*, HighFive de *Trichoplusia ni*, sont d'autres exemples de systèmes d'expression hétérologue utilisés, bien que moins fréquemment, pour l'expression d'OR d'insecte (Lundin et al. 2007, Smart et al. 2008, Tsitoura et al. 2010).

Dans ces systèmes cellulaires, on utilise généralement l'expression transitoire couplée à l'imagerie calcique pour mesurer les réponses des cellules (Kiely et al. 2007, Jordan et al. 2009): l'activation des OR entraîne des flux calciques dans les cellules qui sont visualisés par un marqueur fluorescent. Des méthodes de patch-clamp sont aussi utilisables (Sato et al. 2008, Wicher et al. 2008, de Fouchier et al. 2014, Montagné et al. 2015). Cependant le nombre de cellules Sf9 ou HEK exprimant effectivement l'OR à tester au sein d'une culture est très faible (10-30%) (Thomas and Smart 2005). Pour atteindre le haut-débit, il est préférable de constituer des lignées stables, c'est à dire exprimant l'OR de façon constitutive. C'est ce qui a été fait pour les HEK (Corcoran et al. 2014).

2.2.2 Expression en ovocytes de xénope

Un autre système *in vitro*, qui est en l'occurrence le plus utilisé pour la déorphanisation des OR d'insectes, est celui de l'expression en ovocytes de xénope couplé à la technique d'électrophysiologie à deux électrodes en courant clampé (TEVC pour « two-electrode voltage clamp », en anglais) (Figure 26). L'expression d'OR d'insectes dans des ovocytes de xénope a été testée pour la première fois pour caractériser la fonction d'un OR chez la drosophile (Wetzel et al. 2001). Ensuite, une première caractérisation fonctionnelle chez l'ordre des Lépidoptères a eu lieu avec l'identification du récepteur au bombykol de *B. mori* (Sakurai et al. 2004). Depuis, nombre de récepteurs phéromonaux de lépidoptères et quelques OR d'autres ordres d'insectes (abeille, moustique) ont été déorphanisés en utilisant ce système (quelques exemples d'études sont détaillés dans le tableau 1 ci-dessous).

Tableau 1. Résumé des travaux qui ont utilisé l'expression en ovocytes de xénope couplé au « two-electrode voltage clamp » pour la déorphanisation d'OR d'insectes.

Espèces	Références
B. mori	Nakagawa et al. 2005
Apis mellifera	Wanner et al. 2007
Anopheles gambiae	Lu et al. 2007
Plutella xylostella, *Mythimna separata* et *Diaphania indica*	Mitsuno et al. 2008

B.mori larve et adulte	Tanaka et al. 2009
Ostrinia capulatis et *O. latipennis*	Miura et al. 2009, 2010
Anopheles gambiae	Wang et al. 2010
Heliothis virescens	Wang et al. 2011
Plutella xyllostella	Sun et al. 2013
Helicoverpa armigera	Liu et al. 2013b, Di et al. 2017
Spodoptera litura	Zhang et al. 2013a, 2015
H. assulta et *H. armigera*	Jiang et al. 2014

En général, les ovocytes de xénope sont co-injectés avec les ARNc codant pour un OR spécifique et pour le corécepteur Orco. La présence d'Orco augmente de manière significative la sensibilité et la spécificité de chaque OR (Nakagawa et al. 2005). Les ARNc sont préparés par transcription *in vitro* à partir de plasmide contenant la séquence codante de l'OR à caractériser. Il est également possible d'injecter directement les plasmides dans le noyau des ovocytes, ce qui évite l'étape de transcription *in vitro*.

La différence majeure par rapport aux autres stratégies *in vitro* présentées est la méthode d'acquisition des données. La réponse d'un ovocyte de xénope exprimant un OR est mesurée par électrophysiologie en utilisant deux électrodes et un courant clampé : on mesure la quantité de courant à injecter pour maintenir le courant à un niveau donné. Les ovocytes de xénope présentent l'avantage d'être faciles à manipuler, grâce à leur grande taille. Ils sont de véritables machines à expression d'ARN, et des systèmes automatisés de TEVC sont maintenant disponibles, ce qui facilite leur utilisation pour le criblage fonctionnel à haut débit (Leisgen et al. 2007, Papke and Smith-Maxwell 2009, Papke and Stokes 2010).

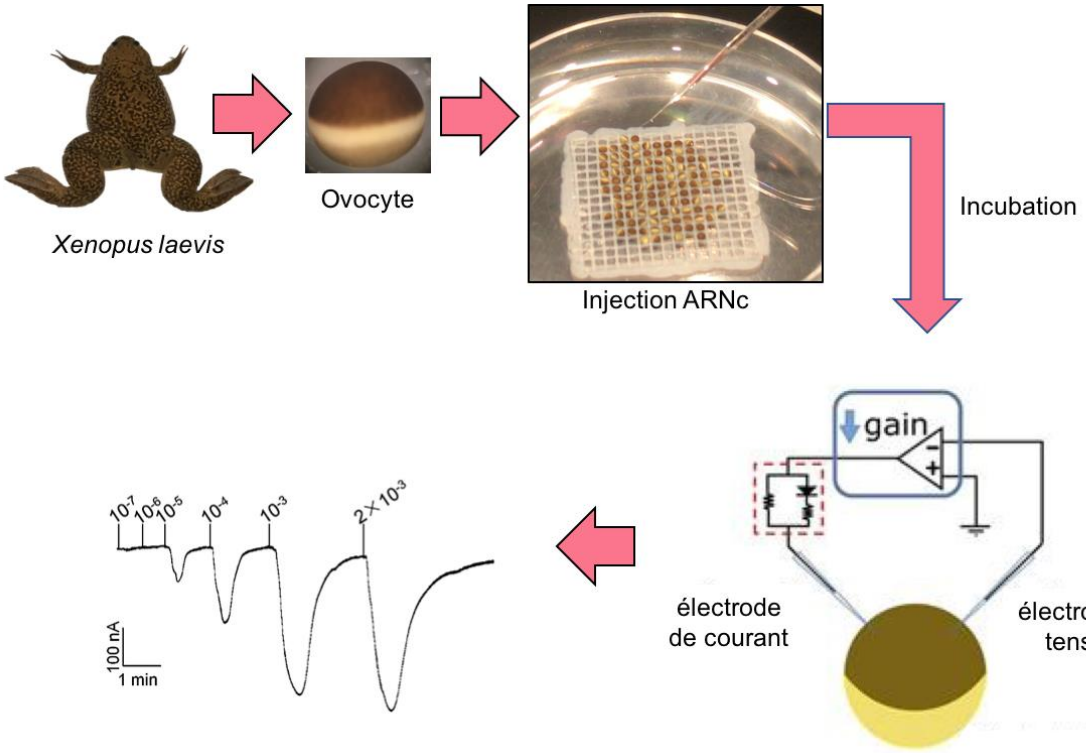


Figure 26. Système d'expression hétérologue en ovocytes de xénope couplé au « two-electrode voltage clamp ». Les ovocytes de xénope sont injectés avec l'ARNc, laissés pour incubation pendant 2-3 jours et ensuite, ils sont clampés avec deux électrodes (l'un va appliquer le voltage et l'autre va mesurer le courant de la membrane). Les réponses sont obtenues en forme de courbe, où le potentiel de membrane représente la réponse du récepteur pour un ligand (adapté de Kvist et al. 2011, Wang et al. 2016).

2.3 Autres méthodes : interférence ARN et édition des gènes

Ces systèmes d'expression hétérologue nous permettent de viser un récepteur particulier pour l'étudier plus en détail de façon individuelle et déterminer son ou ses ligands. Cependant, de nombreuses questions restent sans réponse, notamment le ou les sites de liaison aux ligands ou les acides aminés importants impliqués dans la reconnaissance du ou des ligands restent inconnus ; également l'importance de l'OR dans la réponse comportementale ne peut pas être jugée : en raison du codage combinatoire, la détection d'un ligand donné peut être assurée par plusieurs OR. Dans ce contexte, l'invalidation partielle (par interférence d'ARN ou RNAi, appelée "knock-down") ou totale (par délétion génétique ou "knock-out") de gène peut s'avérer très utile pour comprendre le rôle d'un gène donné dans la réponse de l'individu.

Les approches RNAi n'éteignent pas complètement l'expression du gène ciblé, donc il peut être difficile de détecter un effet, mais elles ont cependant l'avantage de pouvoir être utilisées sur un grand nombre d'espèces non-modèles, puisqu'il suffit en théorie de synthétiser un ARN complémentaire (ou des fragments) du transcript ciblé et de l'injecter dans l'individu ou le tissu

cible (Fire et al. 1998). Cependant, certains insectes ou certains transcrits se sont avérés réfractaires au RNAi, c'est le cas de bon nombre de Lépidoptères (Terenius et al. 2011).

Les approches qui font appel à la transgénèse ("knock-out" : délétion d'un gène, "knock-in": introduction d'un nouveau gène) sont longtemps restées limitées aux espèces modèles. Mais aujourd'hui, de nouvelles techniques révolutionnaires d'édition de gènes (telles que CRISPR / Cas9 ou d'autres déjà testées depuis plusieurs années comme ZFN, TALEN…) aident à mieux comprendre l'importance des OR ou d'autres protéines dans la détection et la signalisation olfactive.

Ces méthodes de knock-down et knock-out sont détaillées brièvement ci-dessous en incluant des exemples réalisés sur certains gènes liés à l'olfaction chez différents insectes.

2.3.1 L'ARN interférence

L'ARN interférence est une méthode puissante pour diminuer l'expression génique (Couzin 2002), médiée par des ARN interférents courts (siRNA). Cette méthode a été largement utilisée pour réduire l'expression des gènes (« silencing » en anglais) et pour définir leur fonction (Jackson et al. 2003, Jackson and Linsley 2004). Chez les insectes, cette technique a été utilisée pour étudier l'influence de l'expression d'Orco chez la drosophile. Elle a montré qu'une réduction du niveau d'expression d'Orco affecte considérablement la détection des odeurs, permettant d'établir les premières hypothèses du fonctionnement des récepteurs dans des complexes hétéromériques (OR+Orco) (Larsson et al. 2004, Neuhaus et al. 2005). Une autre étude menée sur l'hémiptère *Apolygus lucorum* a montré que le knock-down partiel d'Orco, en utilisant des petits ARN interférents (siRNA), a clairement affecté la réponse des antennes aux phéromones sexuelles et aux odeurs des plantes (Zhou et al. 2014).

2.3.2 Les nucléases à doigts de zinc

Les nucléases à doigts de zinc (ZFN, pour « Zinc-finger nucleases » en anglais) sont des réactifs de clivage d'ADN qui ont été adoptés comme outils de ciblage génique. L'architecture des ZFN combine un domaine de liaison à l'ADN d'une classe polyvalente de facteurs de transcription eucaryotes - protéines à doigts de zinc (ZFP) - avec le domaine nucléase de l'enzyme de restriction *FokI*. En raison de leur structure, les ZFN combinent les qualités favorables des deux composants - spécificité de liaison à l'ADN et souplesse des ZFP, et activité de clivage robuste mais restreinte en l'absence d'événement de liaison spécifique - tout en conservant la modularité fonctionnelle (Urnov et al. 2010, Carroll 2011).

L'efficacité des ZFN pour l'édition de gènes a été démontrée chez *D. melanogaster* par Bibikova et al. (2002). Toutefois, les défis importants pour la conception de ZFN efficaces, ainsi que leurs coûts de production importants, ont été des facteurs limitant leur utilisation. L'utilisation d'endonucléases comme agents mutagènes a été utilisé sur le moustique *Aedes aegypti*, pour générer des mutations ciblées sur Orco (Degennaro et al. 2013).

2.3.3 Les TALEN

Les TALEN (« Transcription Activator-Like Effector Nucleases » en anglais) sont construits par fusion des protéines TALE à l'endonucléase *FokI*, ce qui donne des endonucléases artificielles spécifiques d'une séquence d'ADN. Ils induisent des ruptures double brin, qui sont soit réparées par jonction d'extrémités non homologues sujette à erreur (NHEJ), ou par réparation par homologie dirigée (HDR) (Zhang et al. 2014a). La conception et la construction de TALEN sont considérablement plus faciles que les ZFN, et les TALEN présentent l'avantage supplémentaire d'une spécificité de ciblage élevée sans clivage significatif hors cible de l'ADN. Bien que l'application de TALEN ait grandement facilité la mutagenèse, leur mise en œuvre reste longue et coûteuse car il faut générer les nucléases au cas par cas (Lee et al. 2015).

Cette méthode d'édition de gènes a été déjà utilisée chez plusieurs insectes tels que les moustiques *A. aegypti et A. gambiae*, la mouche *D. melanogaster* et les papillons *B. mori* et *Ostrinia furnacalis* (Liu et al. 2012, Ma et al. 2012, Aryan et al. 2013, Smidler et al. 2013, Sakurai et al. 2015, Yang et al. 2016).

2.3.4 Le système CRISPR/Cas9

Les CRISPR (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » en anglais) sont des séquences répétées trouvées en très grand nombre dans les génomes de bactéries et d'archées, et qui jouent un rôle important dans la dynamique de ces génomes. Couplés à des nucléases (les Cas), les CRISPR forment aussi un système immunitaire adaptatif qui permet à ces microbes de reconnaître et de dégrader spécifiquement l'ADN intracellulaire étranger (Sorek et al. 2013). Ce système CRISPR-Cas a servi de base à un nouvelle technologie d'édition de génomes, qui nécessite uniquement la nucléase Cas9 couplée à un ARN guide unique pour couper une séquence spécifique (Carroll 2014). Les détails du fonctionnement de cette technique sont illustrés dans la figure 27.

Les technologies d'édition du génome basées sur CRISPR/Cas9 sont simples et peu coûteuses à concevoir et connaissent par conséquent une augmentation de leur utilisation chez les insectes (Reid and O'Brochta 2016). Ainsi des études sur l'olfaction chez *B. mori, S. littoralis*, *M. sexta* et *Locusta migratoria* ont montré le succès et les avantages de cette technique par rapport aux méthodes utilisées précédemment (*e.g.*,ZFN, TALEN) (Li et al. 2016, Koutroumpa et al. 2016, Fandino et al. 2019, Zhang et al. 2019, Bastin-Héline et al. 2019).

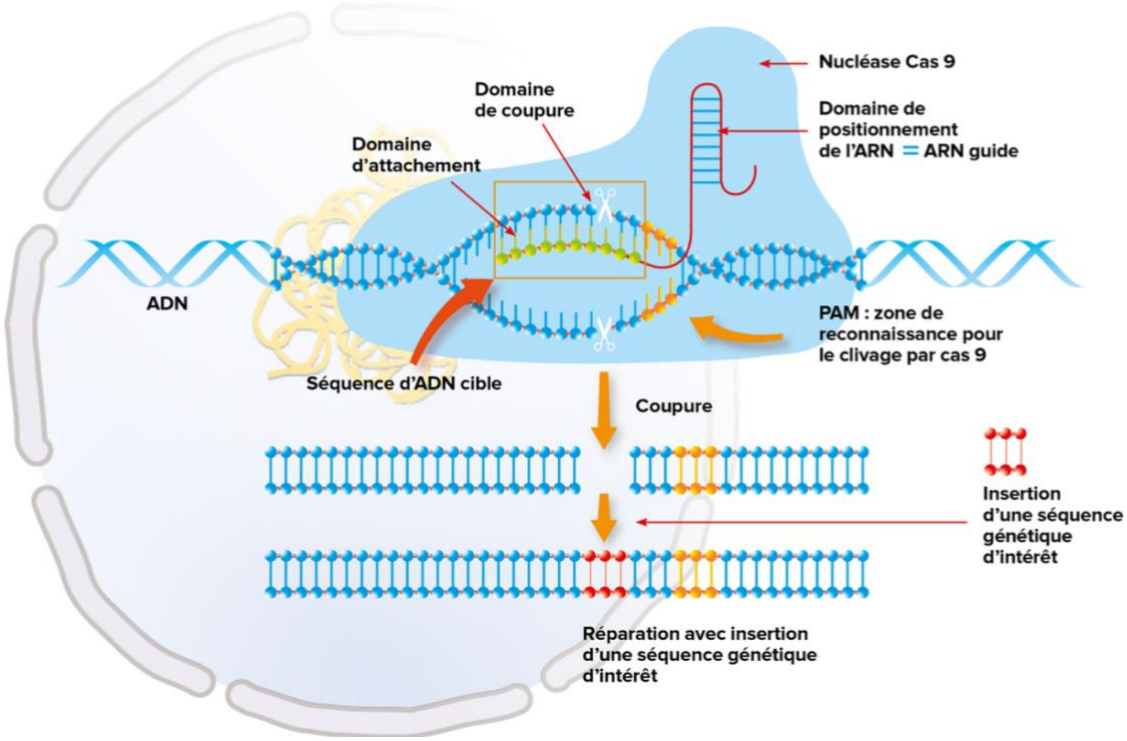


Figure 27. Retouche génomique par le système CRISPR-Cas9. Ce système utilise une nucléase, Cas9 (CRISPR-associated), qui complexée à un ARN guide complémentaire de la séquence cible, clive l'ADN de façon spécifique en amont d'une séquence PAM (Protospacer Adaptor Motif) localisée sur l'ADN génomique (source image: GNIS pédagogie).

PARTIE IV : Structure et modélisation

Même si les OR d'insectes sont de plus en plus étudiés, on ne connaît quasiment rien des interactions moléculaires entre les OR et leur(s) ligand(s). Où est le site de liaison ? Quels sont les acides aminés importants ? Quels acides aminés forment le pore ionique ? Comment s'associent les sous-unités OR et Orco pour former le complexe fonctionnel ? Quelle est la stoechiométrie de ces complexes ? Et la question majeure reste "peut on prédire les ligands d'un OR en connaissant sa séquence ?", ce qui simplifierait les lourdes études de déorphanisation. En effet, le nombre de molécules odorantes existant dans la nature est presque infini. Il n'est pas possible de tout tester expérimentalement sur un OR donné, et seule une infime fraction des interactions entre les substances odorantes et les récepteurs peut être testée en pratique. Une meilleure connaissance de la structure tridimensionnelle des OR et le développement d'approches de modélisation pour la prédiction *in silico* d'interactions OR-ligand permettraient de répondre à ces questions et de faciliter l'identification de nouvelles molécules odorantes actives sur les OR.

1 Structure 3D des OR d'insectes

L'étude de la structure 3D des récepteurs membranaires a longtemps été confrontée à des difficultés techniques. La première structure à avoir été établie est celle de la rhodopsine, et bon nombre de structures de GPCR (Récepteurs Couplés à des Protéines G) ont pu être modélisées en se basant sur cette structure (Palczewski et al. 2000). Par la suite, plusieurs autres structures de GPCR ont été découvertes (Persuy et al. 2015).

Cependant, comme présenté en **partie II**, les OR d'insectes ne sont pas des GPCR, leur topologie est inversée et ils fonctionnent en hétéromères. Ces caractéristiques ont été un véritable frein à leur étude tridimensionnelle, jusqu'au développement récent de techniques de microscopie comme la cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Ainsi, la première structure d'un OR d'insecte a été établie en 2018 sur l'Orco d'une guêpe des figues *Apocrypta bakeri* (Butterwick et al. 2018). Aucune autre structure d'OR d'insecte n'a été publiée à ce jour.

Orco s'assemble en un tétramère et vu de la surface extracellulaire, Orco forme un moulinet tétramérique d'environ 100 Å de diamètre et 80 Å dans les axes avec quatre sous-unités entourant un pore central (Figure 28). Orco peut être divisé en deux domaines : quatre domaines transmembranaires périphériques attachés de manière lâche et un seul domaine d'ancrage central hermétique. Le faisceau hélicoïdal cytoplasmique situé au centre du micelle est le « domaine d'ancrage » car il contient la majorité des interactions inter-sous-unités décrites et « ancre » ainsi les quatre sous-unités peu serrées dans la membrane micellaire ou lipidique (figure 28) (Butterwick et al. 2018). Puisqu'un seul Orco doit s'assembler et fonctionner avec possiblement des centaines d'OR distincts au sein d'une espèce donnée, la conservation stricte d'Orco est probablement nécessaire pour préserver la fonctionnalité à travers ces divers complexes.

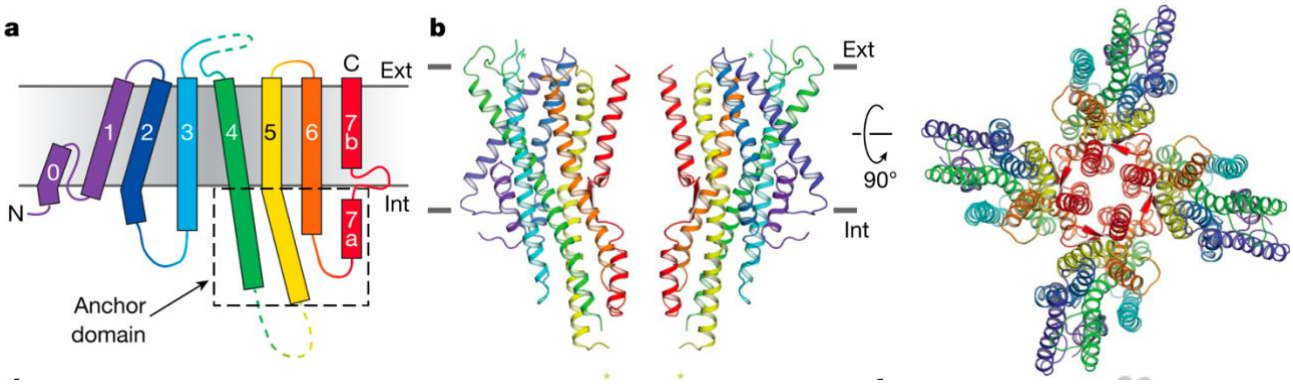


Figure 28. Architecture de l'homotétramère d'Orco. A : Topologie d'une sous-unité Orco. **B :** Représentation en ruban d'un homomère d'Orco vu de profil (à gauche, deux sous-unités) et du dessus (à droite, quatre sous-unités) (d'après Butterwick et al. 2018).

2 Prédiction in silico de ligands : méthodologie

Les outils actuels de chimio-informatique (basés sur l'apprentissage automatique, ou "machine learning" en anglais) permettent de classer des molécules comme inactives ou actives contre une cible particulière (Melville et al. 2009). Cela peut donc être appliqué au criblage virtuel (VS pour "virtual screening" en anglais) de molécules, destiné à identifier de nouveaux composés actifs sur les OR d'insectes (Lavecchia and Di Giovanni 2013). Le criblage virtuel peut être classé en deux catégories : basé sur la structure (structure-based virtual screening ou SBVS en anglais) et basé sur le ligand (ligand-based virtual screening ou LBVS) en fonction de la quantité d'informations structurelles et bioactives disponibles (Melville et al. 2009, Lavecchia 2015). Comme présenté ci-dessus, les informations sur la structure des récepteurs olfactifs d'insectes sont encore extrêmement limitées, la seule structure disponible pour le moment étant celle du corécepteur Orco d'une guêpe (Butterwick et al. 2018). Cela empêche pour l'instant l'utilisation efficace d'une méthode SBVS (Lavecchia and Di Giovanni 2013).

L'autre possibilité consiste donc à partir des ligands eux-mêmes - s'ils sont connus pour un récepteur donné - et de leurs caractéristiques pour proposer d'autres ligands potentiels, grâce à l'approche LBVS (Geppert et al. 2010). Les méthodes LBVS, dont le but est de rechercher dans les bases de données chimiques pour trouver les composés qui correspondent le mieux à une requête donnée, sont populaires car elles sont peu coûteuses en calcul et faciles à utiliser (Lavecchia 2015). Cette approche "ligand-ciblée" nécessite d'avoir déjà des informations (même partielles) sur la fonction de l'OR considéré et n'est pas envisageable pour des OR orphelins, mais elle peut cependant être très utile pour élargir la connaissance du spectre de réponse d'un OR. En effet, ce n'est pas parce que 2 ou 3 ligands ont été identifiés, généralement suite à un crible limité d'odorants (maximum 150 dans les publications de plus grande envergure (Hallem and Carlson 2006, Kreher et al. 2008)), que l'ensemble des ligands de l'OR sont connus, ni même que le ou les ligands les plus actifs ont été identifiés. Par ailleurs, de telles approches ligand-ciblées permettent potentiellement d'identifier des super-agonistes, antagonistes ou bloquants des OR, qui pourraient

prendre tout leur sens dans un contexte de biocontrôle visant à perturber la détection olfactive des insectes néfastes.

Les relations structure-activité quantitatives (QSAR pour le nom en anglais « Quantitative Structure-Activity Relationships ») sont une méthode *in silico* "ligand-based" utilisée pour prédire l'activité biologique de produits chimiques non testés, en fonction des propriétés chimiques partagées par les molécules actives déjà identifiées (Figure 29) (Mansouri and Judson 2016). Cette méthode a été utilisée efficacement pour explorer l'espace chimique des récepteurs olfactifs de mammifères et pour identifier certaines informations clés dans le processus de modélisation (Bushdid et al. 2018).

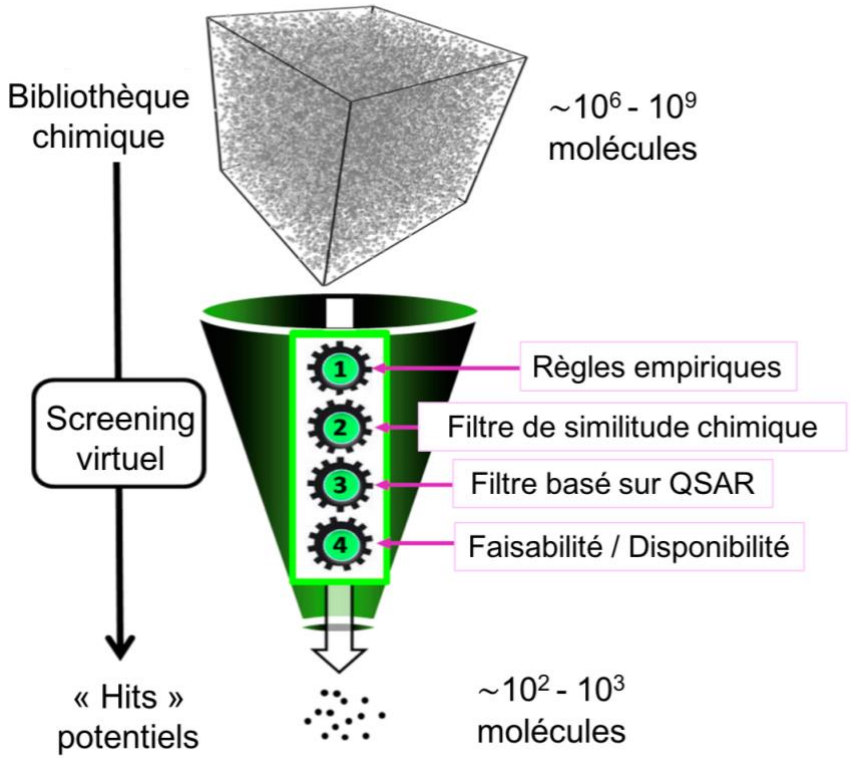


Figure 29. Workflow pour le criblage d'une banque de substances chimiques à l'aide d'un filtrage empirique et basée sur une QSAR (d'après Cherkasov et al. 2014).

3 Application de la chimio-informatique aux OR d'insectes

Les méthodes de prédiction *in silico* des ligands pour des OR d'insecte ont été utilisées avec succès surtout pour l'identification de molécules ayant un effet sur les Diptères (drosophile et anophèle). En utilisant une approche de chimioinformatique, Boyle et al. (2013) ont ainsi identifié des caractéristiques structurelles communes de ligands connus d'OR de drosophile pour cribler *in silico* des nouveaux ligands candidats dans une base de données de plus de 240 000 molécules

potentielles. Les expériences fonctionnelles ont montré un taux de réussite élevé de 71% des molécules prédites qui activaient ou inhibaient effectivement les récepteurs, contre seulement 10% pour le témoin.

L'approche de machine learning a aussi été utilisée pour identifier de nouvelles molécules antagonistes d'Orco chez *A. gambiae*. Ainsi Kepchia et al. (2019) ont utilisé les résultats de tests fonctionnels pour réaliser des modèles d'apprentissage automatique afin de classer l'activité probable d'une bibliothèque de 1280 molécules odorantes. Les tests fonctionnels réalisés en utilisant des composés actifs prédits ont révélé un enrichissement pour les antagonistes d'Orco, dont plusieurs sont structurellement distincts des antagonistes connus auparavant. Ces résultats montrent l'efficacité de l'utilisation des méthodes de machine learning pour l'identification des molécules antagonistes ayant un effet sur le comportement de l'insecte. Cependant il est déconseillé de cibler Orco pour développer ce type d'approches, car Orco est hautement conservé parmi les espèces d'insectes, et les molécules ayant un effet antagoniste pour Orco chez le moustique ou la drosophile auraient probablement également un effet sur d'autres espèces non ciblées.

Tauxe et al. (2013) ont identifié les caractéristiques physico-chimiques associées à l'activation ou à l'inhibition des GRs de moustiques responsables de la détection du CO_2. A partir des ligands connus, ils ont criblé *in silico* une base de données de > 440 000 structures chimiques pour identifier des molécules agonistes ou antagonistes. Sur les 138 molécules testées en électrophysiologie, 30% ont été actives sur les récepteurs ciblés. Cette approche a permis l'identification des nouvelles molécules non-toxiques pour l'environnement et aux prix abordables, dont un antagoniste qui réduit l'attraction pour la peau et un agoniste qui attire les moustiques vers des pièges aussi efficacement que le CO_2, pour une utilisation dans une nouvelle génération de stratégies de lutte contre les moustiques (Tauxe et al. 2013).

D'autres études utilisant cette approche "ligand-ciblée" ont réussi à prédire des molécules répulsives potentielles pour remplacer l'utilisation du DEET (N,N-Diethyl-3-methylbenzamide), composé utilisé couramment pour se protéger contre les moustiques mais ayant des effets négatifs sur la santé et la résistance des insectes (Katritzky et al. 2008, Oliferenko et al. 2013, Zhang et al. 2013b, Boyle et al. 2016).

PARTIE V : Le modèle d'étude Spodoptera littoralis

1 Origine et aire de répartition

Le genre *Spodoptera* appartient à la famille des Noctuidae, plus importante en nombre d'espèces au sein des Lépidoptères (plus de 40 000 espèces, soit un quart de tous les Lépidoptères). De nombreuses espèces de noctuelles ont été étudiées à des fins différentes, et notamment pour comprendre le fonctionnement des sens chimiques (olfaction et gustation) chez les insectes (Carroll et al. 2006, Binyameen et al. 2014, Liu et al. 2014a, Rharrabe et al. 2014, Cheng et al. 2017, Gouin et al. 2017, de Fouchier et al. 2018).

Spodoptera littoralis, la noctuelle du coton, est un insecte polyphage dont les dégâts aux cultures sont causés par les chenilles. Les adultes se nourrissent du nectar et ils remplissent essentiellement des fonctions reproductives. Cet insecte est présent dans toute l'Afrique et s'étend vers l'est jusqu'au Moyen Orient et au nord en Espagne, en Italie et dans le sud de la France (Figure 30). La limite de répartition de *S. littoralis* en Europe correspond à la zone climatique dans laquelle les gelées d'hiver sont peu fréquentes.

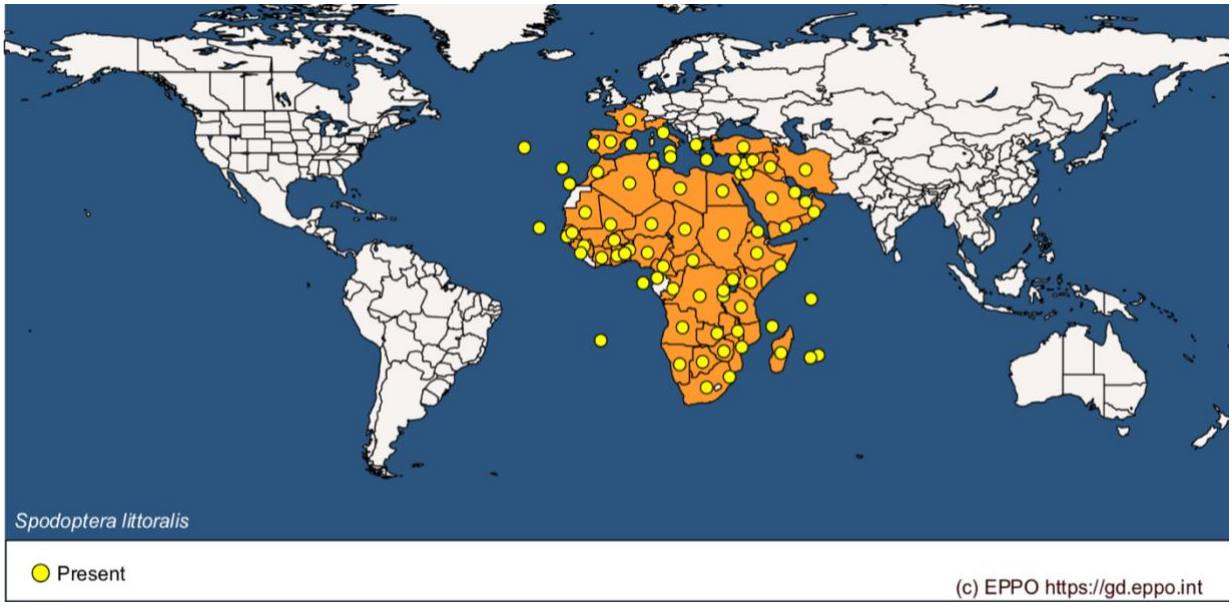


Figure 30. Aire de répartition de *Spodoptera littoralis* d'après l'EPPO 2019 (European Plant Protection Organisation). Les cercles jaunes représentent la présence de cette espèce dans les différentes régions, principalement en Afrique, Moyen-Orient et sud de l'Europe (bassin méditerranéen).

2 Cycle de vie et biologie

Comme les autres insectes holométaboles, les lépidoptères passent par différents stades de développement : œuf, larves, nymphe et adulte (Figure 31). Chez *S. littoralis*, le cycle de vie dure environ 35 à 60 jours en fonction de la température (Ellis 2004). Jusqu'à huit générations continues

peuvent se succéder par an dans les régions plus chaudes, et au moins deux générations au sud de l'Europe (European Food Safety Authority 2015).

La ponte est regroupée en plaques où les œufs sont collés les uns aux autres (ooplaques). En privilégiant le dessous des jeunes feuilles dans la partie supérieure des plantes, les femelles peuvent pondre plus de 3 000 œufs au cours de leur vie, chaque ooplaque contenant de 20 à 500 œufs couverts d'écailles (Brown and Dewhurst 1975). Les œufs éclosent 4 à 12 jours après la ponte.

Il existe 7 stades larvaires chez *S. littoralis*, la durée totale des stades larvaires étant d'environ 20 jours. Les chenilles mesurent entre 2 et 45 mm selon le stade. Lorsqu'elles atteignent le dernier stade larvaire, les chenilles cessent de se nourrir et vont s'enfouir dans le sol. Elles se transforment en chrysalides, stade auquel se produit une métamorphose complète. La chrysalide de couleur marron-rouge mesure de 15 à 20 mm de long, et la détermination du sexe peut se réaliser à ce stade, où - à la différence des larves - il existe un dimorphisme sexuel. Le stade chrysalide dure 10 à 13 jours.

Une fois pleinement développé, l'adulte émerge en cassant l'enveloppe de la chrysalide (Powell 2009). Les papillons nouvellement émergés sont actifs du crépuscule à l'aube. Les femelles atteignent la maturité sexuelle dès le deuxième jour après l'émergence (Dunkelblum et al. 1987). Les adultes vivent entre 5 et 10 jours à 25°C et ils possèdent une capacité de dispersion de 1,5 km en 4 heures (Salama and Shoukry 1972).

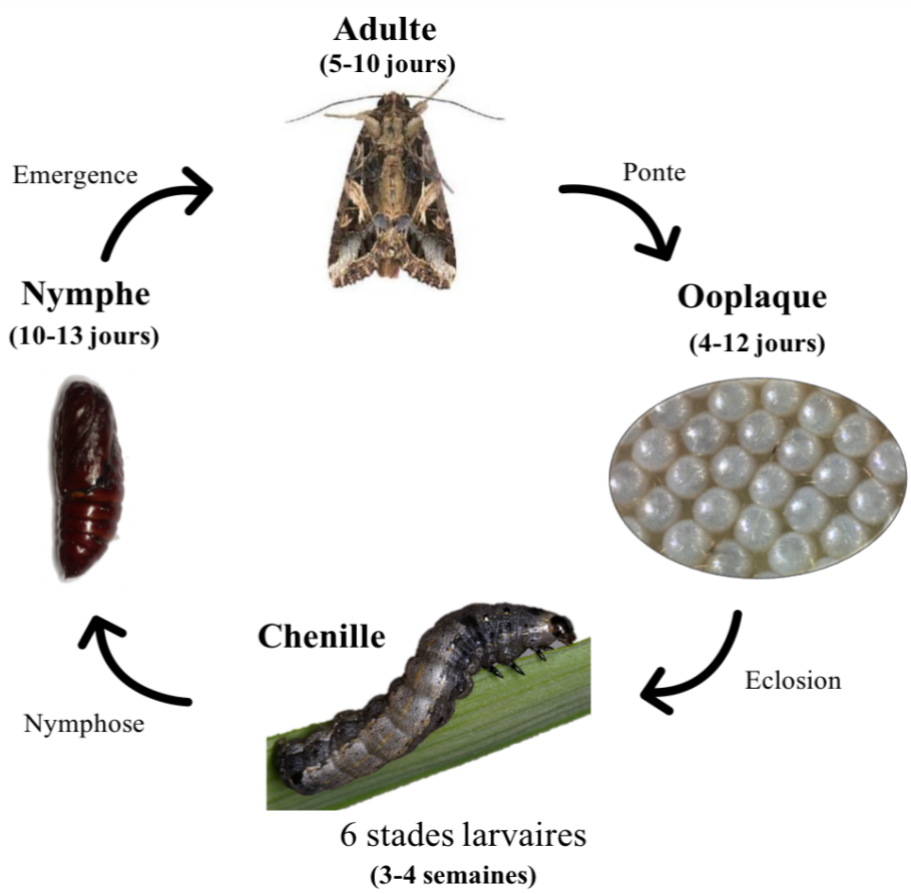


Figure 31. Cycle de vie de *Spodoptera littoralis*.

3 Impact agronomique du genre *Spodoptera*

Les chenilles de *S. littoralis* sont très polyphages, elles ont été identifiées sur de nombreuses espèces de plantes provenant de plusieurs familles différentes (Salama et al. 1971) notamment les crucifères, les arbres fruitiers à feuilles caduques, les herbes, les légumineuses, les plantes médicinales et ornementales. Huit familles constituent plus de 50% des hôtes connus : fabacées, solanacées, malvacées, moracées, astéracées, poacées, chénopodiacées et brassicacées (Ellis 2004). Les plantes hôtes les plus connues pour *S. littoralis* sont le coton, le trèfle, la luzerne, le niébé et le maïs (Anderson et al. 2013, Thöming et al. 2013, Proffit et al. 2015).

Les larves de *S. littoralis* préfèrent se nourrir de jeunes feuilles tendres. Elles peuvent également se nourrir de jeunes pousses, de tiges, de capsules, de bourgeons et de fruits, en perforant les organes, ce qui facilite l'infection par des agents pathogènes dans la plante hôte. Sur les hôtes nouvellement infestés, les jeunes larves se nourrissent à de nombreux petits points d'alimentation qui finissent par s'étendre sur toute la feuille. Les stades avancés forment de grands trous, consomment totalement des feuilles, ou creusent de jeunes pousses ou des sections nues sur les jeunes tiges, les capsules et les bourgeons. Si les larves se nourrissent abondamment d'une jeune plante, son développement est retardé et elle ne peut produire que de petits fruits ou des fruits tardifs (Ellis 2004), voire mourir.

Parmi les espèces les plus nuisibles au sein du genre *Spodoptera*, on retrouve également *S. frugiperda*, insecte polyphage qui se nourrit de plus de 80 cultures différentes. Cette espèce est originaire des Amériques, présente en Afrique centrale et occidentale depuis 2016 (FAO 2019, Sisay et al. 2019), trouvée pour la première fois en 2018 en Asie (Yémen et Inde), et depuis janvier 2019 présente également au Bangladesh, Myanmar, Sri Lanka, Thaïlande et en Chine (Ganiger et al. 2018, FAO 2019).

Spodoptera exigua, également connue comme la noctuelle de la betterave, est présente presque dans le monde entier (sauf en Amérique du Sud) et est responsable de dégâts importants aux cultures. Cependant, elle est très sensible aux températures froides qui l'empêchent d'hiverner (Zheng et al. 2011).

Une autre espèce très polyphage présente en Asie et en Océanie (EPPO 2019) est *S. litura*, responsable de pertes importantes de rendement des cultures en Chine et en Inde. *S. littoralis* est une espèce sœur de *S. litura*, les deux espèces occupant des distributions géographiques distinctes (EFSA 2015).

4 Méthodes de lutte contre *S. littoralis*

L'utilisation d'insecticides de synthèse constituent la méthode la plus courante pour lutter contre ce ravageur, mais des résistances sont apparues (Elghar et al. 2005). Une autre méthode largement utilisée est l'utilisation de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt), qui possède une propriété insecticide contre les noctuelles. La toxine contenue dans la bactérie se lie à des récepteurs spécifiques dans l'intestin de l'insecte qui va cesser de manger et finira par mourir

(Navon et al. 1983). Mais là aussi des résistances apparaissent (Sneh and Schuster 1983). Des études sur des moyens de lutte biologique recourant à l'utilisation de parasites, prédateurs, virus ou champignons ont également été menées (Salama et al. 1989). Enfin une troisième stratégie de lutte est employée, basée sur l'utilisation des phéromones sexuelles afin d'effectuer du piégeage en masse, via la méthode « leurrer et tuer » (lure and kill en anglais), ainsi que pour le suivi de population (Figure 32 A,B) (McVeigh and Bettany 1987).

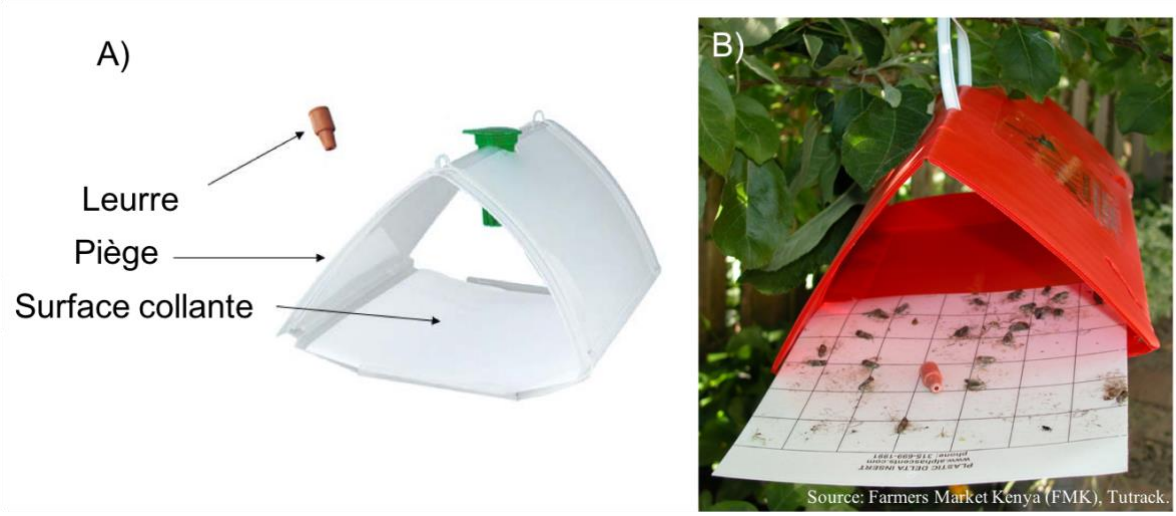


Figure 32. Système de piégeage par phéromone sexuelle. A : Piège Delta, leurre, et papier collant. **B :** Piège delta dans le champ, le leurre contient des phéromones qui attirent les papillons mâles, ces derniers une fois arrivés à la source, resteront collés.

5 Organes olfactifs périphériques et centraux chez *Spodoptera littoralis*

5.1 Organes olfactifs périphériques des adultes et des chenilles

La morphologie des organes dédiés à la détection des molécules odorantes (principalement les antennes et les palpes) ainsi que la distribution des sensilles ont été décrites en détail chez les adultes *S. littoralis* (Binyameen et al. 2012, Seada 2015). La forme de l'antenne est filiforme, c'est-à-dire allongée, mince et avec des segments de taille et de forme presque identiques. Elle est composée d'un scape, d'un pédicelle et d'un flagelle. Le flagelle possède entre 65 et 80 segments densément chargés de sensilles.

Huit types de sensilles ont été documentés pour cette espèce : trichoïde, basiconique, auricillique, coeloconique, uniporeux, chaetique, styloconique et squamiforme (Figure 33). Ces sensilles sont présentes dans tous les segments de l'antenne, mais les plus abondantes sont les trichoïdes et basiconiques (Popescu et al. 2013, Seada 2015). Les mâles possèdent un plus grand nombre des sensilles trichoïdes par segment (75-100) que les femelles (50-60). Pour les sensilles basiconiques et coeloconiques le nombre ne diffère pas beaucoup entre les sexes, respectivement 40 et 8 par segment (Ljungberg et al. 1993, Seada 2015).

Deux aspects ont principalement été étudiés chez les adultes de *S. littoralis* : la détection de la phéromone chez les mâles et la détection des odeurs de plantes chez la femelle (Tamaki and Yushima 1974, Quero et al. 1996, Saveer et al. 2012, Zakir et al. 2013). Les spectres de réponse d'une quarantaine d'OSN ont été étudiés jusqu'à présent chez les femelles (Anderson et al. 1995, Jönsson and Anderson 1999, Binyameen et al. 2012, 2014). Chez les mâles, 3 types fonctionnels d'OSN ont été signalés comme responsables de la détection des composés phéromonaux et 9 types activés par des COV de plantes (Ljungberg et al. 1993, Anderson et al. 1995). Le nombre de types fonctionnels d'OSN est lié au nombre d'OR exprimés dans chaque espèce. Chez S. littoralis l'analyse des nouveaux transcriptomes et du génome (non-publié) ont permis l'identification d'environ 70 OR candidats. On peut donc s'attendre selon la règle "un récepteur – un neurone" (Touhara et al. 1999) à ce qu'il reste encore un nombre important de type d'OSN à caractériser pour mieux comprendre le système olfactif périphérique de cette espèce.

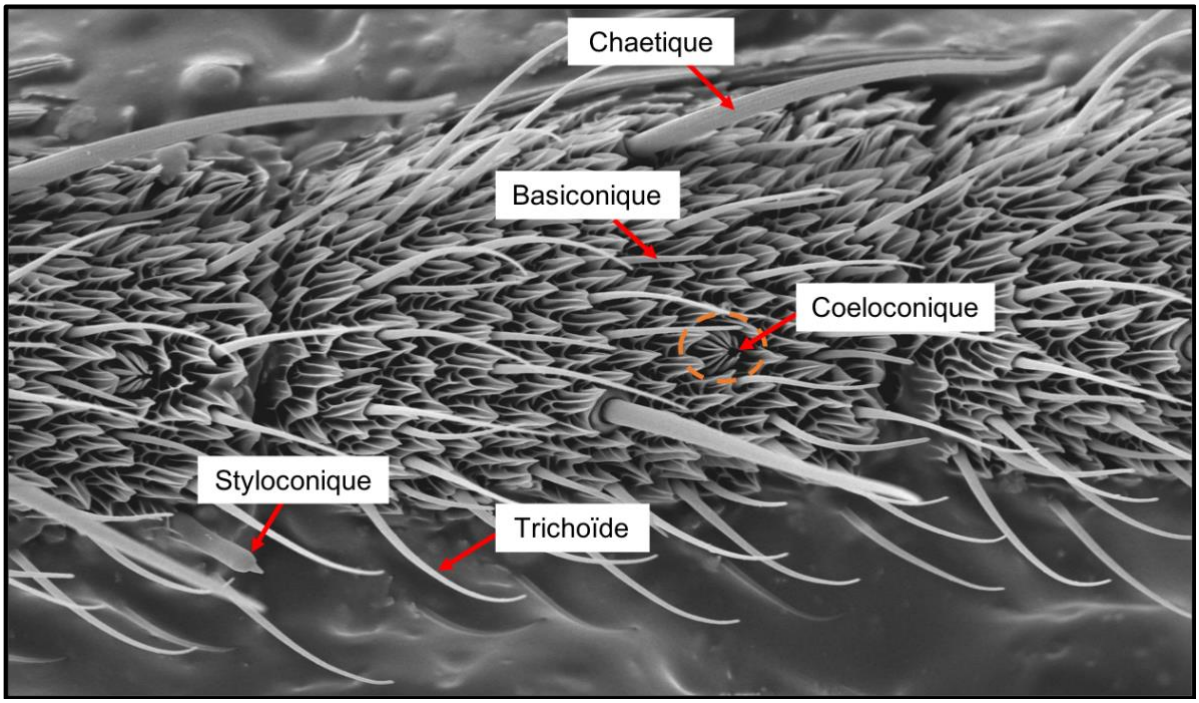


Figure 33. Différents types de sensilles chez *Spodoptera littoralis.* (Chaetique, basiconique, coeloconique , trichoïde, styloconique. Crédit photo : M-C François & C. Monsempes.

Les organes olfactifs des chenilles de *S. littoralis* suivent l'organisation décrite dans la partie II, section 1.4., c'est à dire qu'ils consistent en une paire d'antennes et une paire de palpes maxillaires. L'électrophysiologie est extrêmement délicate à réaliser chez les chenilles, et les types fonctionnels d'OSN ne sont pas caractérisés. Seule une étude rapporte l'enregistrement monosensillaire d'une sensille basiconique du 3eme segment de l'antenne (Poivet et al. 2012). De façon étonnante, cette sensille montre une réponse électrique suite à la stimulation par la phéromone sexuelle de cette espèce (Poivet et al. 2012).

5.2 Lobe antennaire et glomérules

Le lobe antennaire de *S. littoralis* est constitué de 63 glomérules de taille très variable (Couton et al. 2009). Un groupe de glomérules élargis, formant le complexe macro-glomérulaire (MGC pour « macro glomerular complex » en anglais), est présent uniquement chez les mâles. Ces glomérules reçoivent les afférences des OSN détectant spécifiquement les composés phéromonaux Z9,E11-14:OAc, Z9,E12-14:OAc et Z9-14:OH (Figure 34). Chez la femelle, aucune structure MGC n'a été trouvée, mais un glomérule “ordinaire” est cependant présent à un endroit similaire à celui du MGC mâle (Ochieng et al. 1995). Les représentations des substances odorantes non phéromonales sont généralement similaires chez les mâles et femelles (Carlsson et al. 2002).

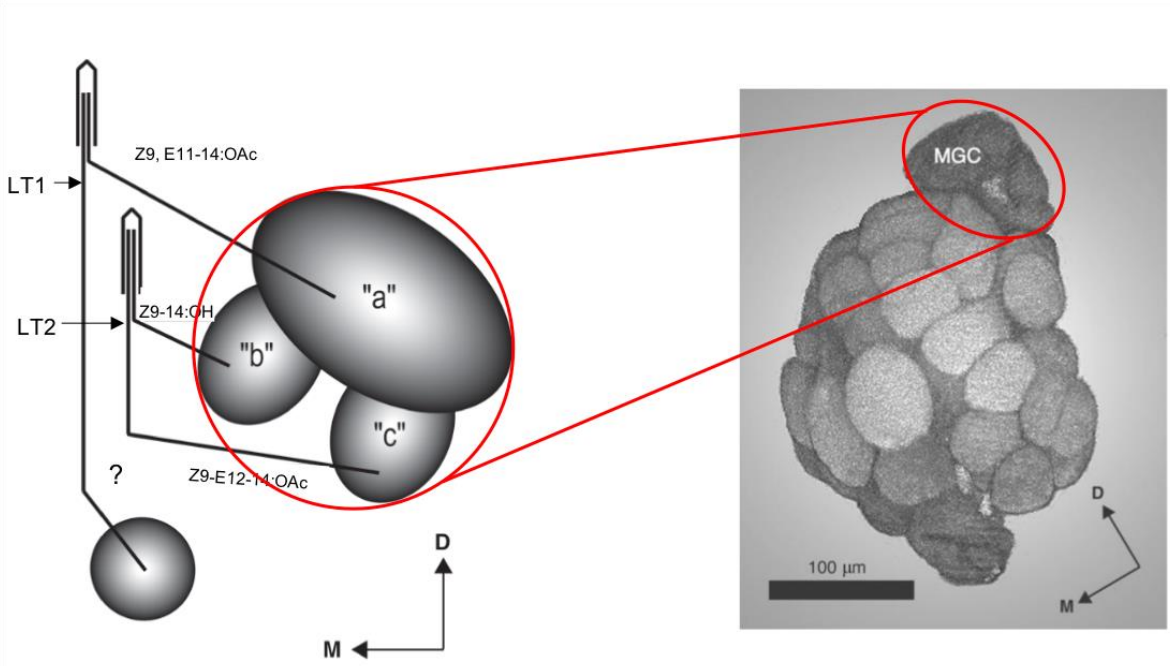


Figure 34. Le complexe macroglomérulaire (MGC) chez les mâles de *S. littoralis*. Deux types de sensilles trichoïdes sont représentés (LT1 et LT2). Les OSN LT1A, LT2B et LT2C se projettent dans le MGC. L’OSN LT1B se projette dans un glomérule ordinaire (hors du MGC). M : medial. D : dorsal. Figure adaptée de Carlsson et al. 2002.

Chez les chenilles l’étude des centres olfactifs primaires et secondaires a été très peu étudié, la plupart des études se focalisent sur les adultes. Chez les insectes holométaboles, les événements de développement du cerveau et du lobe antennaire sont séparés dans le temps (Salecker and Malun 1999). La structure des lobes antennaires est en corrélation avec la complexité des antennes larvaires. Chez les larves de *M. sexta*, les OSN des chimiorécepteurs des antennes et palpes se projettent dans le lobe antennaire larvaire glomérulaire et ont des terminaisons dans les glomérules (Kent and Hildebrand 1987).

6 Les odeurs clés dans l'écologie de *S. littoralis* : phéromones et odeurs de plantes

6.1 Les phéromones

La composition du bouquet phéromonal émis par les femelles de *S. littoralis* dépend fortement de l'origine de la souche, avec des différences dans la nature des composés présents et leurs proportions relatives, comme l'a montré l'analyse des bouquets phéromonaux de populations de Chypre, du Kenya, d'Israël et d'Espagne (Nesbitt et al. 1973, Tamaki and Yushima 1974, Dunkelblum et al. 1982, Martinez et al. 1990, Navarro et al. 1997, Muñoz et al. 2008). Le composé majoritaire synthétisé par les femelles de *S. littoralis* est toujours le (Z,E)-9,11-14:OAc (entre 33% et 95% en fonction des souches). D'autres composés minoritaires font également partie du bouquet phéromonal : le (Z)9-14:OAc (3 à 46%, presque jamais absent), le (E)11-14:OAc (9 à 14%, presque jamais absent), le 14:OAc (7 à 11%, pas toujours présent dans le mélange), le (Z)11-14:OAc (5 à 7%, pas toujours présent dans le mélange), le (Z,E)-9,12-14:OAc (0,5 à 5%, rarement présent) et le (E,E)-10,12-14:OAc (11 à 14 %, rarement présent) (Figure 35).

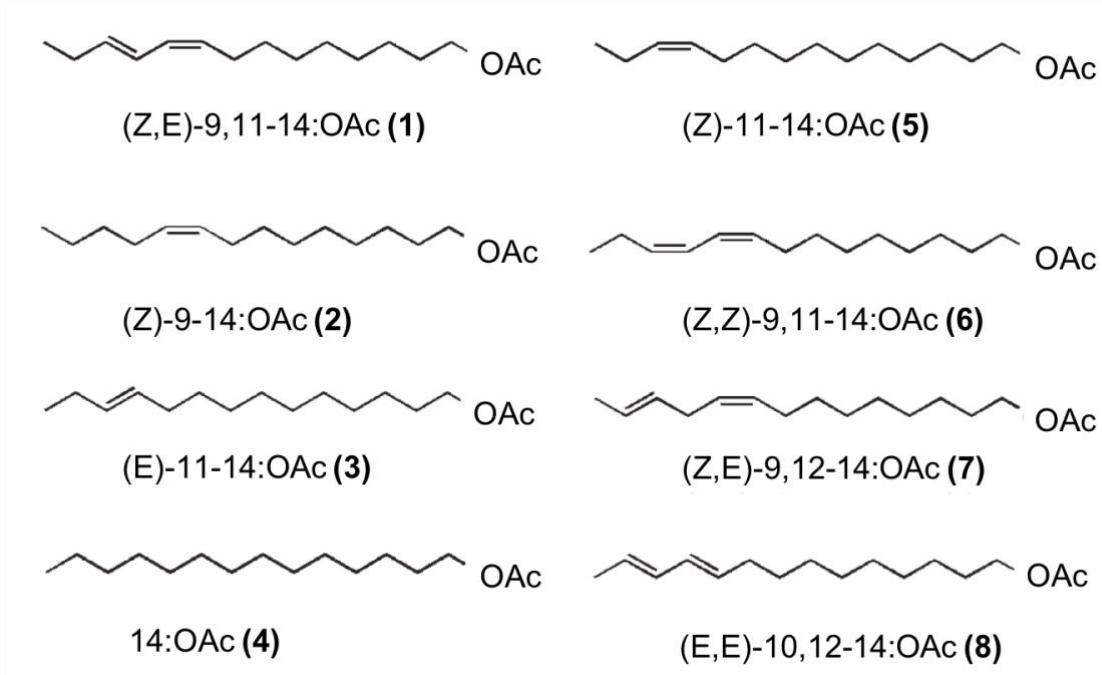


Figure 35. **Composants de la phéromone sexuelle de *S. littoralis*** (d'après Muñoz et al. 2008).

Des enregistrements d'électroantennogrammes de mâles ont montré que le composé majoritaire, le (Z,E)-9,11-14:OAc donnait la réponse antennaire la plus élevée, suivi des composés minoritaires (Z)9-14:OAc et (Z)9-12:OAc (Ljungberg et al. 1993). Des expériences en tunnel de vol et en champ ont montré que la présence du composé majoritaire seul suffit pour déclencher un comportement d'attraction à distance chez les mâles, équivalent à celui provoqué par les femelles vierges (Kehat et al. 1976, Quero et al. 1996). Les composées minoritaires testés seuls sont significativement moins attractifs que le composé majoritaire, mais les mélanges en différents

proportions avec le composé majoritaire peuvent augmenter leur efficacité (Campion et al. 1980, Dunkelblum et al. 1982).

Des études fonctionnelles sur les récepteurs phéromonaux de *S. littoralis* en utilisant l'expression hétérologue chez la drosophile ont permis d'identifier le récepteur au composé majoritaire (Bastin-Héline et al. 2019) et deux récepteurs impliqués dans la détection de composés minoritaires de la phéromone (Montagné et al. 2012, de Fouchier et al. 2015). Une étude réalisée sur les chenilles de *S. littoralis* montre qu'elles sont également capables de détecter la phéromone sexuelle, suggérant qu'elles associent ce signal à une source de nourriture (Poivet et al. 2012).

6.2 Les odeurs de plantes

Les odeurs des plantes sont des composés clés pour les insectes, les signaux provenant des plantes hôtes étant par exemple des messages attractifs qui guident les insectes pour trouver une source de nourriture ou des sites de ponte. Les molécules provenant des plantes non hôtes sont perçues comme des substances à éviter, en générant des signaux d'alerte qui vont les permettre d'adopter un comportement particulier. Un mélange de trois composés normalement présents dans le coton, une des plantes hôtes de *S. littoralis* – le (Z)-3 hexenyl acétate, (E)-β-ocimene et (R)-(+)-limonène - ont été testés en tunnel de vol, se révélant attractifs pour les mâles et femelles de *S. littoralis*. Au contraire, le 4,8-dimethyl-1,3(E),7-nonatriene (DMNT) et le (R)-(−)-linalool, deux composés de défense des plantes, peuvent réduire l'attraction en vol pour les deux sexes (Borrero-Echeverry et al. 2015). Des tests d'oviposition sur des plantes de coton saines et des plantes avec dégâts suggèrent que les femelles préfèrent pondre sur des plantes non endommagées en évitant les plantes qui émettent des HIPV (« Herbivore-induced plant volatiles ») car elles offrent de meilleures conditions pour leur descendance (Zakir et al. 2013). Dans une autre étude, des mélanges de 6 composés présents dans les excréments des larves dont des terpènes et des composés aromatiques (carvacrol, eugénol, nérolidol, phytol, thymol et benzaldéhyde) montrent que ces composés inhibent également fortement la ponte (Anderson et al. 1993).

Concernant l'effet d'odeurs de plantes sur la larve, Mérey et al. (2013) ont montré que les COV émis par les plantes de maïs qui avaient subi des dégâts par des herbivores attiraient les larves, mais l'exposition aux substances volatiles diminuait le taux de croissance des chenilles aux premiers stades de développement. Neuf composées des plantes ont été classés comme étant actifs sur le comportement des chenilles de *S. littoralis*, notamment le 1-hexanol, le (Z)3-hexenol, le benzyl alcohol et l'acétophénone (de Fouchier et al. 2018) ainsi que le cis-jasmone et l'hexanal en fonction des doses testées (Rharrabe et al. 2014).

Salloum et al. (2011) ont étudié l'apprentissage appétitif et aversif chez les larves de *S. littoralis*, montrant que les larves sont capables de mémoriser rapidement des informations cruciales pour leur survie (*e.g.* odeurs des plantes) à la suite d'une brève expérience de conditionnement gustatif. Ainsi, la mémoire à court terme pourrait aider les larves à s'adapter à leur environnement dans de nombreuses situations. Par exemple si la plante hôte choisie par la femelle

pour pondre est inappropriée pour les larves, l'apprentissage associatif les aiderait à s'installer sur un hôte approprié.

7 Gènes chimiosensoriels chez *S. littoralis*

Des études pionnières sur les gènes chimiosensoriels ont été réalisées sur cette espèce. Dès 2011, des transcrits codants pour des protéines de l'olfaction ont été décrits par notre laboratoire par une stratégie de séquençage Sanger d'étiquette de gènes exprimés (ou EST de l'anglais Expressed Sequences Tag) à partir d'une banque d'ADNc d'antennes mâles adultes (Legeai et al. 2011) puis d'antennes femelles (Jacquin-Joly et al. 2012). Ainsi, 13000 transcrits antennaires ont été obtenus, parmi lesquels 29 OBP et 14 CSP, 2 SNMP, 12 IR (Olivier et al. 2011), 36 OR potentiels et le co-récepteur Orco (Malpel et al. 2008), ainsi que 5 GR. Également, 941 séquences ont pu être classées dans différentes catégories enzymatiques (Legeai et al. 2011), parmi lesquelles de potentielles ODE (Durand et al. 2010, Legeai et al. 2011).

Afin de compléter ces données, un transcriptome d'organes chimiosensoriels des chenilles a été réalisé par la suite par la combinaison d'une des premières méthodes NGS, le séquençage 454 (pyroséquençage) et l'Illumina (Poivet et al. 2013). L'analyse de ces nouvelles données a permis l'identification de nouveaux gènes olfactifs, portant le total à 47 OR, 17 IR et 48 protéines de liaison (CSP et OBP), complétant ainsi le répertoire connus des gènes olfactifs de *S. littoralis*. Une analyse en RT-PCR systématique de l'expression de gènes chimiosensoriels dans les organes olfactifs des adultes (mâles et femelles) et des chenilles (antennes et palpes) a été réalisée (Poivet et al. 2013) menant au bilan ci-dessous:

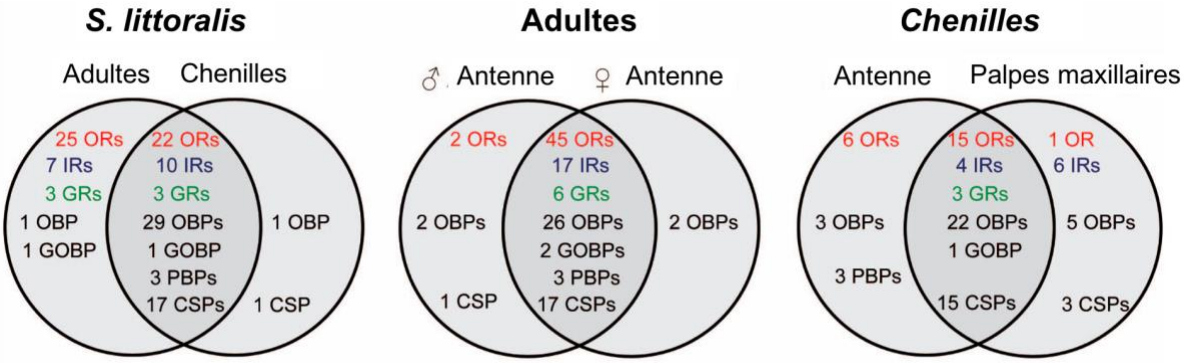


Figure 36. Distribution des gènes chimiosensoriels chez les adultes et les larves de *S. littoralis* (d'après Poivet et al. 2013).

Chez *S. littoralis*, 63 glomérules ont été identifiés dans le lobe antennaire. Si l'on considère comme admis le paradigme du ratio un OR pour un glomérule du lobe antennaire, il est clair que tout le répertoire des OR n'a pas encore été identifié chez cette espèce. En particulier, aucun OR spécifique de chenille n'a été identifié. Il est pourtant probable que de tels OR existent chez *S.*

littoralis, comme cela a été démontré chez les chenilles de *B. mori* (Tanaka et al. 2009) ou les chenilles de *Cydia pomonella* (Walker et al. 2016) pour qui des candidats d'OR larve-spécifiques ont été mis en évidence.

8 Que connaît-on de la fonction des OR de *S. littoralis* ?

8.1 Récepteurs phéromonaux

L'analyse phylogénétique des SlitOR (OR de *S. littoralis*) et des OR de papillons a permis d'identifier 4 SlitOR positionnés dans un clade qui regroupe des nombreux récepteurs phéromonaux (PR) des papillons de nuit, suggérant qu'ils seraient eux aussi des PR. Leur étude fonctionnelle en utilisant l'expression hétérologue chez la drosophile (système en sensille T1) a montré que deux répondent à des composés minoritaires de la phéromone, mais les deux autres n'ont pas donné de réponse à aucun des composés phéromonaux testés (Montagné et al. 2012, de Fouchier et al. 2015).

L'analyse du taux d'expression des SlitOR a révélé un OR fortement exprimé dans les antennes adultes et très enrichi chez les mâles (Figure 37 A). Bien qu'il ne se positionne pas dans la famille classique des PR (Figure 37 B), cette caractéristique en faisait un bon candidat pour le récepteur au composé majoritaire de la phéromone sexuelle.

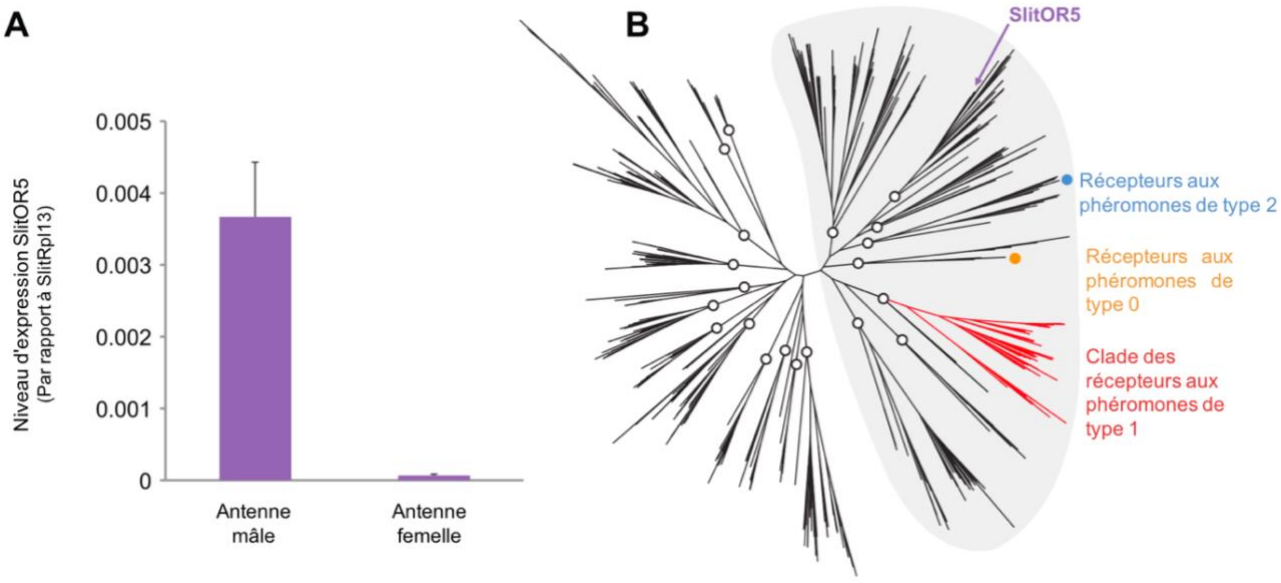


Figure 37. Le récepteur SlitOR5 est fortement exprimé chez les mâles mais n'appartient pas au clade des récepteurs phéromonaux. A : Niveaux d'expression de SlitOR5 dans les antennes mâles et femelles adultes de *S. littoralis*, mesurés par qPCR en temps réel. **B :** Phylogénie du maximum de vraisemblance non racinée des OR de lépidoptères, basée sur 506 séquences d'acides aminés de neuf espèces, chacune appartenant à une superfamille différente. La position de SlitOR5 et des récepteurs pour les composés phéromonaux de type 0, I et II est indiquée. Les cercles sur les nœuds indiquent les lignées paralogues d'OR (d'après Bastin-Héline et al. 2019).

L'étude fonctionnelle de SlitOR5 par expression en sensille T1 de drosophile et en ovocyte de xénope a confirmé cette hypothèse, révélant un récepteur très sensible et très spécifique au (Z,E)-9,11-14:OAc (Bastin-Héline et al. 2019). La mise en évidence d'un PR hors du clade classique des PR de lépidoptère a permis de proposer l'hypothèse inédite que les PR des papillons de nuit sont apparus au moins deux fois au cours de l'évolution.

8.2 Récepteurs non phéromonaux

Une étude d'envergure a été menée au laboratoire pour étudier la fonction d'autres SlitOR. Ainsi, pendant sa thèse, Arthur de Fouchier a utilisé le système du neurone vide (sensilles basiconiques) de la drosophile pour exprimer 35 SlitOR et tester leur réponse par électrophysiologie monosensillaire en utilisant un panel de 50 composés, choisis dans la littérature comme étant actifs en électrophysiologie ou sur le comportement chez cette espèce (voir partie 5.6). Dix-sept SlitOR ont ainsi pu être déorphanisés (de Fouchier et al. 2017). C'est la première fois qu'un tel large répertoire a pu être caractérisé chez un insecte non diptère.

En effet au préalable, seuls deux larges répertoires avaient été caractérisés, l'un chez l'insecte modèle par excellence *D. melanogaster* (Hallem et al. 2004b, Kreher et al. 2005, 2008, Hallem and Carlson 2006, Mathew et al. 2013b) et l'autre chez l'anophèle (Carey et al. 2010, Wang et al. 2010). Les données obtenues montrent, comme attendu, qu'il existe des OR à large spectre (*e.g.* SlitOR25), d'autres à spectre très étroit (*e.g.* SlitOR31). Les données ont également permis de construire une phylogénie fonctionnelle des OR de lépidoptères (Figure 38), révélant une certaine conservation dans la nature chimique des ligands selon les clades d'OR. Par exemple, les OR des clades les plus basaux répondent à des composés aromatiques, et les clades les plus divergents plutôt à des composés aliphatiques et des terpènes (de Fouchier et al. 2017).

Bien que l'étude des OR d'insectes a toujours suggéré qu'il n'y a aucune relation entre la séquence primaire des protéines et leur fonction (en d'autres termes qu'il est impossible de prédire le ou les ligands d'un OR à partir de sa séquence), ces observations montrent au contraire, chez les lépidoptères au moins, une certaine conservation de fonction. Cette phylogénie fonctionnelle peut servir d'outil précieux pour la caractérisation de tout nouvel OR identifié en réduisant le panel de ligands potentiels à tester. Par exemple, un OR qui localise dans les clades A, B, C, D ou E de la phylogénie ci-dessous répondra surement à des composés aromatiques qu'ils convient de tester en premiers.

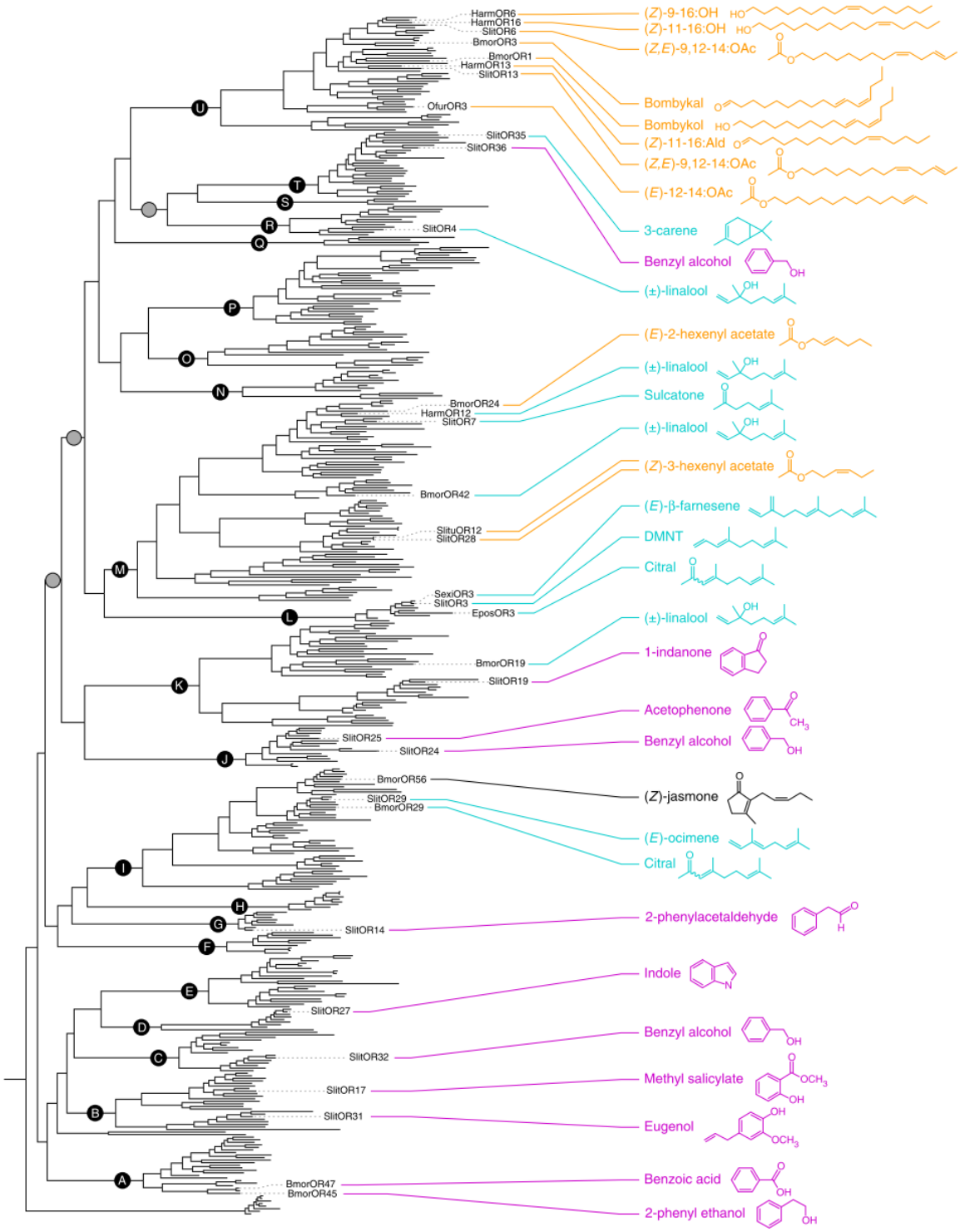


Figure 38. Evolution fonctionnelle des OR de lépidoptères. Phylogénie des OR de lépidoptères, mettant en évidence les ligands principaux identifiés. Les cercles représentent les nœuds fortement soutenus (noir: aLRT >0.95; gris: aLRT >0.9) et les lettres dans les cercles désignent les 21 clades d'OR. Pour chaque récepteur fonctionnellement caractérisé, seul le ligand provoquant la réponse la plus élevée est indiqué. Les couleurs de chaque ligand représentent les différentes classes chimiques: magenta, aromatiques; cyan, terpènes; orange, aliphatiques (d'après de Fouchier et al. 2017).

PARTIE VI : Problématiques, objectives, hypothèses, stratégie du projet de thèse

Les insectes ravageurs sont responsables de dégâts énormes aux cultures. Puisque leurs comportements sont en grande partie entraînés par des molécules odorantes, le système olfactif apparaît comme une cible de choix pour le contrôle de leurs populations. Différentes stratégies basées sur l'olfaction ont été développées pour interférer avec la capacité des insectes à répondre aux signaux olfactifs, mais pour le moment, leurs utilisations sont limitées en raison des coûts et de la difficulté de mise en place de ces pratiques.

Depuis les années 2000, le décryptage des bases moléculaires de l'olfaction chez les insectes a ouvert de nouvelles voies dans la lutte contre les insectes avec la possibilité de cibler directement le système olfactif au niveau moléculaire. Comme nous venons de le voir dans cette synthèse bibliographique, l'événement décisif a été la découverte, tout d'abord pour l'insecte modèle *Drosophila melanogaster*, des récepteurs olfactifs (OR) qui lient et reconnaissent des stimuli chimiques. Ces OR sont des cibles particulièrement pertinentes pour la conception de "bio-olfacticides" sélectifs (agonistes / antagonistes / bloquants) qui pourraient interférer avec la réponse de l'OR et donc avoir capacité de perturber la réponse des insectes aux signaux olfactifs (comme répulsifs / attractifs / inactivateurs). Chez les insectes vecteurs de maladies comme les moustiques, de telles études visant à cibler les OR sont bien avancées.

Chez les lépidoptères, les mécanismes de communication sexuelle (via les phéromones) et la sélection des plantes hôtes ont longtemps été étudiés chez les papillons adultes dans le cadre des stratégies de protection des plantes. Il ressort de l'analyse bibliographique précédente que l'olfaction chez les larves a été très peu étudiée, pourtant ce stade de développement est responsable des dommages causés aux cultures. **Afin de combler cette lacune, mon sujet de thèse a consisté 1) à étudier les bases moléculaires de l'olfaction des chenilles de *Spodoptera littoralis* et 2) à tester la possibilité de cibler les OR de ravageurs pour la protection des cultures, et étendre ainsi le concept de "bio-olfacticides" au biocontrôle des herbivores.**

Plus spécifiquement je me suis attachée dans un **premier objectif** à identifier les OR exprimés par les chenilles de *S. littoralis* par une approche transcriptomique, afin de compléter les premiers transcriptomes déjà réalisés au laboratoire à une époque où les NGS ne permettaient pas une couverture optimale du transcriptome. Comme vu dans la synthèse bibliographique, aucun OR spécifique de chenille n'avait pu être mis en évidence chez cette espèce. Pourtant, l'écologie olfactive des chenilles et des adultes est très différente. Ainsi, un de mes objectifs a été de rechercher de tels OR. Le **deuxième objectif** a été de mettre en œuvre deux approches d'expression hétérologue (drosophile et xénope) pour leur étude fonctionnelle, ceci afin de mieux comprendre comment les chenilles mobilisent un répertoire d'OR pour détecter les molécules odorantes pertinentes de leur environnement. Puis le **troisième objectif** a été de tester s'il est possible, comme pour les moustiques, de mettre en œuvre une approche de modélisation pour prédire de nouveaux ligands d'OR pour à terme dessiner des bio-olfacticides. En collaboration avec des Chimistes de

l'université de Nice (Chemosim lab. Jérôme Golebiowski & Sébastien Fiorucci), qui ont une vaste connaissance sur la modélisation des ligands chez les vertébrés, nous avons testé la capacité des techniques de « machine learning » à accélérer la découverte de nouveaux ligands actifs sur le récepteur ciblé en les couplant à la validation expérimentale. Enfin, le **dernier objectif** a été d'explorer le comportement larvaire associé aux ligands nouvellement identifiés, afin de valider l'utilisation des OR comme source de découverte de nouveaux médiateurs chimiques actifs sur les comportements.

Ces informations pourront servir pour établir de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes alternatives aux pesticides, et en visant le stade ravageur, stade actuellement peu visé par le biocontrôle à base de médiateurs chimiques. Les données obtenues permettront également de fournir des connaissances fondamentales dans le domaine de la neurobiologie et de l'éthologie des larves.

Objectifs détaillés de la thèse :

1) Identifier les OR exprimés chez les larves de *S. littoralis*

La première chose à faire avant de pouvoir étudier la contribution des OR au comportement des larves a été de déterminer l'ensemble des OR exprimés à un stade donné (ici le stade L4). Comme indiqué ci-dessus, un premier transcriptome avait été réalisé au laboratoire, permettent d'identifier 22 OR exprimés dans les antennes et les maxilles des larves (Poivet et al. 2013). Depuis cette première étude, le génome de *S. littoralis* a été séquencé et est disponible au sein de notre laboratoire. Pour l'ensemble des 74 OR identifiés dans ce génome, mon premier objectif a été de comparer lesquels étaient exprimés chez l'adulte et lesquels étaient exprimés chez la larve, en utilisant la RT-PCR.

Les informations obtenues avec cette technique s'étant révélées parfois trop variables et peu précises, nous avons donc décidé de démarrer au cours de la 2ème année une approche transcriptomique par RNAseq sur les organes olfactifs des chenilles de *S. littoralis*. Grâce à cela, j'ai pu identifier l'ensemble des OR larvaires, et quantifier leurs niveaux d'expression dans les antennes et les maxilles. Comparées avec les résultats obtenus pour les adultes, ces données m'ont permis d'identifier notamment des OR potentiellement spécifiques du stade larvaire, et donc jouant possiblement un rôle important dans leur comportement olfactif (par exemple pour la reconnaissance des plantes hôtes).

2) Déterminer les spectres de réponse des OR exprimés chez les larves

Après avoir identifié les OR larvaires, un des objectifs de ma thèse était d'identifier les ligands de ces récepteurs, en me focalisant en priorité sur les OR spécifiquement exprimés chez les

larves. Pour atteindre mon objectif, j'ai utilisé une approche avec a priori (en criblant des odorants prédéterminés) et une approche sans *a priori* en collaboration :

- Approche *a priori*

Dans cette approche, les potentiels ligands pour le crible sont choisis (bibliographie). Nous avons envisagé au début de ma thèse d'utiliser un système de criblage à haut débit par expression en ovocytes de xénope en collaboration avec le CRB Xénope de l'Université de Rennes I (robot automatisé de TEVC). Au cours de plusieurs séjours à Rennes, j'ai participé à la mise au point de ce système et à son optimisation mais pour des raisons qui seront expliquées dans ce manuscrit, les résultats n'ont pas été concluants.

J'ai donc changé de système d'expression hétérologue pour mon projet, pour utiliser un système déjà bien connu dans notre laboratoire : l'expression en « neurone vide » de la drosophile couplé à l'enregistrement monosensillaire. J'ai créé des lignées de drosophiles exprimant chacune un des 7 OR identifiés comme potentiellement spécifiques des chenilles, et j'ai ainsi pu déorphaniser 2 de ces récepteurs par un crible utilisant des odorants sélectionnés.

- Approche sans *a priori* par GC-SSR

En parallèle, j'ai approfondi l'étude fonctionnelle de SlitOR exprimés chez les chenilles en participant à une approche sans a priori par GC-SSR. Cette étude a été réalisée au travers d'une collaboration de notre laboratoire avec un laboratoire étranger (Université suédoise des sciences agricoles, Alnarp, Suède). L'approche menée au sein de ce laboratoire a été d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée au SSR sur des drosophiles exprimant des OR de *S. littoralis*, afin d'identifier des molécules présentes dans les odeurs de plantes hôtes et actives sur les OR. Ainsi, des extraits de plantes sont injectés en GC, et les molécules un fois séparées viennent stimuler les neurones de drosophiles exprimant un SlitOR donné. Toutes les molécules composant le bouquet odorant de la plante considérée sont alors testées, sans sélection. Les plantes choisies pour cette étude ont été des plantes hôtes et non-hôtes de *S. littoralis*. Cependant, il est parfois difficile de savoir quel composé a engendré une réponse électrique de l'OR en SSR, car les mélanges sont complexes et les molécules parfois mal séparées, voire non clairement identifiées. Mon rôle a donc été dans cette étude de vérifier l'activité sur les OR des molécules suspectées, en utilisant des molécules de synthèse et l'enregistrement monosensillaire sur les mêmes lignées de drosophiles. Au final, ce travail a validé l'activité des nouveaux ligands sur des OR exprimés chez la larve.

3) Mise en œuvre d'une approche de modélisation pour prédire de nouveaux ligands d'OR

Cette approche a été menée comme preuve de concept sur deux SlitOR exprimés chez les chenilles, en collaboration avec le laboratoire ChemoSim de Nice. Au cours de la thèse d'un précédent étudiant du laboratoire, un lien avait été établi entre l'activation de deux OR exprimés

chez les chenilles (SlitOR24 et SlitOR25) et l'attraction des chenilles. Ces deux SlitOR ont donc été choisis pour cette approche, afin de tester l'efficacité de la modélisation et de sa capacité à identifier *in fine* des molécules actives sur le comportement. Cette approche a combiné la chimie avec la modélisation (chimioinformatique). ChemoSim a prédit de nouveaux ligands potentiellement actifs sur OR24 et OR25 en se basant sur les ligands déjà connus pour ces OR, puis j'ai vérifié par électrophysiologie l'activité des ligands prédits *in silico* et mis ainsi en évidence qu'un grand nombre de ces odorants étaient effectivement actifs sur ces OR. L'approche chimio-informatique utilisée s'est révélée particulièrement efficace.

4) Quelle activité sur le comportement des chenilles ?

Au travers des objectifs précédents, j'ai pu identifier de nouveaux ligands pour des SlitOR. Mais qu'en est-il du comportement induit ? Mon dernier objectif a été d'explorer le comportement larvaire associé aux ligands nouvellement identifiés, en me focalisant sur les ligands des récepteurs SlitOR24 et OR25. L'hypothèse était qu'ils devaient engendrer un comportement d'attraction, car ces OR avaient été montrés comme liés à l'attraction des chenilles. Pour ce faire, j'ai mis en place avec l'aide de Jéremy Gévar (IE-INRA) au sein du laboratoire des tests d'étude du comportement des chenilles par l'utilisation d'olfactomètres en "Y". Jusqu'alors, le comportement des chenilles n'avait été étudié au laboratoire que par des tests en boîtes de Pétri. Les tests comportementaux ont été menés par trois stagiaires (niveau M1, L2 et L3) que j'ai eu l'opportunité de co-encadrer avec mes deux directeurs de thèse et J. Gévar.

Les chapitres suivants présentent ce travail, sous forme d'articles scientifiques publiés ou en préparation. Le **chapitre 1** reporte les résultats de l'objectif 1 (transcriptomique) et aborde l'objectif 2 en présentant l'analyse fonctionnelle avec *a priori* de deux OR spécifiques de chenilles. Le **chapitre 2** poursuit sur l'objectif 2 par l'approche sans a priori par GC-SSR. Le **chapitre 3** présente la modélisation couplée à l'expérimentation de l'objectif 3 (article publié dans la revue Scientific Reports en 2020, (Caballero-Vidal et al. 2020)(Caballero-Vidal et al. 2020). Enfin le **chapitre 4** compile modélisation, validation expérimentale et comportement induit.

Chapitre I : L'analyse transcriptomique du chimiosensome des larves d'une noctuelle polyphage révèle des récepteurs olfactifs potentiellement spécifiques des larves qui sont activés par des composés aromatiques et des terpènes.

Introduction

Au début de ma thèse je me suis intéressée à identifier le répertoire des gènes olfactifs exprimés chez les larves de *S. littoralis*. Des études réalisées précédemment avaient montré que la larve de *S. littoralis* exprime 22 OR alors que 47 OR sont trouvés chez l'adulte (Poivet et al. 2013). Beaucoup de progrès ont été réalisés depuis, avec différents études transcriptomiques (Walker et al., 2019; Koutroumpa et al. *in prep*) et le séquençage du génome (*in prep*), montrant que les adultes de *S. littoralis* expriment beaucoup plus de gènes chimiosensoriels que ceux identifiées dans les études pionnières (Legeai et al. 2011, Jacquin-Joly et al. 2012, Poivet et al. 2013).

Donc pour vérifier le nombre total d'OR exprimés dans les larves, j'ai d'abord tenté de comparer les répertoires d'OR exprimés chez les chenilles et les adultes sur un jeu de 71 OR identifiés dans le génome de *S. littoralis*. Ceci a été effectué en utilisant la technique de RT-PCR. Les informations obtenues avec cette méthode s'étant révélées insuffisamment reproductibles, nous avons décidé de démarrer au cours de ma 2ème année de thèse une approche transcriptomique par RNAseq sur les organes olfactifs des chenilles de *S. littoralis.*

L'approche transcriptomique par RNAseq implique la préparation de librairies et séquençage RNAseq, le nettoyage des séquences (pour enlever des séquences contaminantes, des séquences ribosomiques, etc), l'assemblage des lectures en contigs (assemblage *de novo*), la recherche de séquences par homologie et enfin l'annotation des séquences d'intérêt. A partir de là, il est alors possible de quantifier l'expression des gènes dans différents tissus, ici les antennes et les maxilles. J'ai réalisé toutes ses étapes sur l'outil Galaxy de la plateforme BIPAA (Bioinformatics Platform for Agroecosystem Athropods) hébergée à Genouest à Rennes (https://bipaa.genouest.org/is/). L'assemblage du transcriptome *de novo* à partir des données de RNAseq a été réalisé à l'aide de l'outil Trinity, comme détaillé dans la partie III, section 1.2.2 de la synthèse bibliographique.

Ce transcriptome larvaire a permis l'identification de récepteurs olfactifs potentiellement spécifiques des chenilles et de gènes différentiellement exprimés entre les antennes et les maxilles. Concrètement, cette étude a permis l'identification d'un total de 175 gènes chimiosensoriels répertoriés dans les organes olfactifs des larves, dont 44 OR, 38 GR, 23 IR, 22 CSP, 46 OBP et 2 SNMP. Parmi eux, nous avons identifié 5 OR, 23 GR, 9 IR et 2 OBPs non décrits dans les

transcriptomes antérieurs de *S. littoralis* pour adultes et larves, certains d'entre eux étant donc des gènes chimiosensoriels possiblement spécifiques des larves.

Pour les nouveaux OR identifiés, nous avons effectué une analyse fonctionnelle, en utilisant l'expression hétérologue dans le système *in vivo* de neurone vide de la drosophile. Deux OR ont ainsi été deorphanisés avec succès. Ces OR, nommés SlitOR61 et SlitOR66, ont été activés par plusieurs composés aromatiques et des terpènes. La comparaison fonctionnelle avec les profils de réponse d'OR d'adultes suggère que les chenilles et les papillons pourraient utiliser des OR différents pour détecter les mêmes signaux. Les autres OR n'ayant pas été deorphanisés induisent pourtant une activité spontanée des neurones de drosophile dans lesquels ils ont été exprimés, suggérant qu'ils sont fonctionnels mais qu'il faudra élargir le panel de molécules testées pour essayer des trouver des ligands actifs pour ces OR.

Herbivorous caterpillar chemosensome sequencing reveals larval odorant receptors tuned to aromatics and terpenes

Gabriela Caballero-Vidal, Camille Meslin, Christelle Monsempes, Marie-Christine François, Nicolas Montagné* and Emmanuelle Jacquin-Joly*

INRAE, Sorbonne Université, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Diderot, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France

* Corresponding authors:
Emmanuelle Jacquin-Joly
INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.
emmanuelle.joly@inrae.fr
+33 1 30 83 32 12

Nicolas Montagné
Sorbonne Université, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.
nicolas.montagne@sorbonne-universite.fr
+33 1 44 27 38 37

Abstract

The identification of the repertoire of chemosensory genes in an insect can be carried out using different approaches, such as genome sequencing or transcriptome analysis of the olfactory or gustatory organs. The latter is particularly suitable for knowing the expression of genes under different physiological conditions. It is essential to understand the molecular basis of chimiosensation in the larvae, to comprehend the selection of host plants and feeding preferences processes. In the present work, we present an exhaustive study of a new larval transcriptome from the polyphagous moth *Spodoptera littoralis,* including differential expression analyses of chemosensory genes. Here, we report a total of 175 chemosensory genes identified in the fourth instar larvae, including 37 genes never described before for this species, indicating a deeper sequencing capacity and improved quality of this RNAseq study. Functional studies using the heterologous expression in Drosophila and electrophysiological recordings have been performed on seven of the newly identified odorant receptors, from which two of them have been successfully deorphanized. These receptors (SlitOR61 and SlitOR66) are activated by aromatics and terpenes. The ecological relevance these compounds might have for the larvae are discussed. The larval chemoreceptors identified on this transcriptome and the molecules that can activated/ inhibit them, constitute good targets for crop protection strategies.

INTRODUCTION

Insects make use of chemical cues to accomplish vital activities such as danger avoidance, mating, oviposition and food location. The detection of these cues is mediated by several chemosensory appendages such as antennae, maxillary palps, labial palps and tarsae. These organs bear hair-like expansions called sensilla, which notably contain olfactory sensory neurons (OSNs) or gustatory sensory neurons (GSNs). In insects, three families of transmembrane receptors are responsible for signal transduction in these neurons. Odorant receptors (ORs) are heteromeric ligand-gated ion channels (Sato et al. 2008, Wicher et al. 2008) that are specific to insects (Brand et al. 2018). They form a complex with a conserved co-receptor named Orco (Larsson et al. 2004, Benton et al. 2006, Butterwick et al. 2018). A single OR/Orco heteromer is generally expressed in one particular OSN (Couto et al. 2005). ORs can detect a vast array of volatile molecules, notably terpenes, aromatic and aliphatic molecules (Hallem et al. 2004b, de Fouchier et al. 2017). Gustatory receptors (GRs) are evolutionarily related to ORs, since OR genes diverged from GRs (Robertson et al. 2003). These GRs are expressed in GSNs, where they are responsible for tasting sweet and bitter compounds (Slone et al. 2007, Weiss et al. 2011). As an exception, some GRs are expressed in OSNs where they detect CO_2 (Kwon et al. 2007). Contrary to ORs, multiple GRs can be co-expressed in a single sensory neuron (Freeman and Dahanukar 2015). The third chemoreceptor family consists of the variant ionotropic receptors (IRs), involved in both olfaction and taste as well as other sensory modalities (Rimal and Lee 2018). They function as heteromers of unknown stoichiometry, with some conserved co-receptors (Abuin et al. 2011). Besides these receptor multigene families, other protein families are involved in chemosensation, such as the odorant-binding proteins (OBPs) and the chemosensory proteins (CSPs), which are soluble proteins present in the lymph of olfactory sensilla (Pelosi et al. 2018), as well as sensory neuron membrane proteins (SNMPs), possibly involved in pheromone detection (Benton et al. 2007).

The size of chemosensory receptor gene repertoires largely differs between insect species, as a result of a highly dynamic evolution (Robertson 2019). Moreover, the set of chemosensory genes expressed in a given species can vary throughout the development (Kreher et al. 2005, Xia et al. 2008, Guo et al. 2017). This is particularly true in holometabolous insects, characterized by larval and adult stages with radically different morphologies and life habits (Schoonhoven 1987, Schoonhoven and Van Loon 2002). In Lepidoptera, chemosensory genes expressed in adults have been identified in a plethora of species (Montagné et al. 2015), but data on caterpillars remain scarce (Tanaka et al. 2009, Walker et al. 2016, Chang et al. 2017, Clavijo McCormick et al. 2017, Di et al. 2017a). Since caterpillars represent the herbivorous stage, with little or no feeding at adult stage, a deeper knowledge of the molecular basis of chemosensation is required to better understand mechanisms of host selection and feeding preferences. In addition, many herbivorous caterpillars being crop pests, such knowledge would offer the possibility to develop chemosensory-based strategies of pest management.

To fulfil this need, we report here the transcriptome of larval antennae and maxillae of the noctuid *Spodoptera littoralis*, a polyphagous crop pest present in Africa, the Middle East and Southern Europe (Salama et al. 1971, EFSA 2015). This species has become a model in insect chemical ecology, notably for studying the function and evolution of ORs in Lepidoptera (de Fouchier et al. 2015, 2017, Bastin-Héline et al. 2019). Large sets of chemosensory genes expressed in adults have

been described in detail (Legeai et al. 2011, Jacquin-Joly et al. 2012, Walker et al. 2019; Koutroumpa et al. in prep). A preliminary transcriptomic analysis of larval chemosensory organs identified 87 chemosensory genes (encoding receptors or binding proteins) expressed in fourth-instar larvae (Poivet et al. 2013). Here, we complete this repertoire by a deeper sequencing of transcripts expressed in maxillae and antennae of fourth-instar *S. littoralis* larvae and found a total of 175 chemosensory genes expressed in these tissues, including 44 ORs, 38 GRs, 23 IRs, 22 CSPs, 46 OBPs and 2 SNMPs. Among them, we identified 5 ORs, 23 GRs, 9 IRs and 2 OBPs not described in any of the previous *S. littoralis* adult and larvae transcriptomes, some of them being candidate larvae-specific chemosensory genes. We carried out a functional analysis of the seven larval ORs that were not found in previous adult antennal transcriptomes, using heterologous expression in the *Drosophila* empty neuron system, and identified one OR tuned to several aromatic compounds and one OR tuned to eucalyptol and other terpenes. Functional comparison with adult OR response profiles suggest that caterpillars and moths could use different ORs to detect the same cues.

MATERIALS AND METHODS

Insects and preparation of RNA samples

S. littoralis fourth-instar larvae used for tissue dissections originated from a laboratory culture maintained on a semi-artificial diet (Poitout et al. 1972) at 24°C, 65 ± 5% relative humidity under a photoperiod of 16 h light: 8 h dark. Three replicates of 50 pairs of antennae and 50 pairs of maxillae were dissected and immediately placed in TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA was isolated by adding chloroform and centrifuging, then purified using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), including a DNase I treatment. RNA purity and concentration were measured on a NanoDropTM ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

RNA sequencing and de novo transcriptome assembly

Five µl of each RNA sample were sent to Novogene Co., Ltd (Beijing, China) for directional library preparation and sequencing. Six 250-300 bp insert strand specific libraries were prepared using the NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and sequenced using the HiSeq4000 sequencing platform to generate 150 bp paired-end reads. Data were further processed using the Galaxy tool Version 2.8.3. FastQC was performed on each sample to check the quality of raw reads and low-quality reads were trimmed using Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Parameters were: Sliding window of 4 bases, average quality of 20, minimum length of reads equal to 30. Identification and removal of rRNA-like sequences were done with riboPicker (Schmieder et al. 2012).

A *de novo* transcriptome was assembled using cleaned data from all the six samples using Trinity (Grabherr et al. 2011) with default parameters. Bowtie (Langmead 2010) was used to map the reads on the assembly. Transcript sequences with no read aligned were discarded from the assembly. CD-HIT-EST (Fu et al. 2012) was then used to cluster the nucleotide dataset into representative sequences with a similarity threshold of 0.95 and coding regions were identified using TransDecoder (Haas et al. 2013), with a minimum protein length of 100 amino acids. The

completeness of the assembled transcriptome was assessed using the Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs tool (BUSCO v3.0.2) (Simão et al. 2015) performed against the Insecta odb9 dataset that includes 1658 reference genes.

Differential expression analysis

For each library, raw reads were aligned on the *de novo* transcriptome assembly using Bowtie and abundance was estimated using RSEM (Li and Dewey 2011). Differential expression was analyzed using both DESeq2 (Love et al. 2014) and edgeR (Robinson et al. 2010, Liu et al. 2015). Transcripts with FDR (False Discovery Rate) value below 10 percent were considered as differentially expressed. Heatmap plots were generated from the matrix of TMM (Trimmed Mean of M-values) normalized expression values + 1, using NG-CHM Generator (Version 2.3), with a three-color scale. For each plot, the minimum value was set to zero, midpoint was set to percentile type, with an intermediate value for each plot and the maximum was set to highest value type. For the three chemosensory gene families represented in a heatmap, the range was specified for each tissue type independently, such that the color gradient was set based upon the highest TMM values within each tissue, not across all tissues.

Gene ontology enrichment analysis

Gene ontology (GO) terms were assigned to the transcripts using the annotation of their best tblastx hit against the UniProtKB/Swiss-Prot database (swissprot_v5) using Blast2GO (Conesa et al. 2005). GOslim (Götz et al. 2008) was run to give a broad overview of the ontology. GO enrichment analysis was performed for both antennae and maxillae samples using GOEnrichment (Faria 2017) based on the Fisher Exact Test and Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. Twelve terms with the lowest FDR value (<0.10) were represented in the figures for molecular function (MF) and biological process (BP).

Transcriptome annotation and phylogenetic analyses

The transcripts from the *de novo* assembled transcriptome were annotated using blastx searches against the UniProt database (v.2018_03), using an e-value cutoff of 0.01. In parallel, output files from TransDecoder were used as protein query sequences using blastp against the NR database (v.2018-9-7), with an e-value cutoff of 0.001. Transcripts with hits corresponding to chemosensory genes (either ORs, GRs, IRs, OBPs, CSPs or SNMPs) were retrieved and annotated according to the family. In addition, amino acid sequences of chemosensory genes previously annotated in *S. littoralis* (Poivet et al. 2013, Walker et al. 2019, Koutroumpa et al. in prep) were used as queries in tblastn searches (e-value cutoff 0.01) against the assembled transcriptome to ensure that all chemosensory genes were identified.

Phylogenies were built for chemosensory receptors using deduced amino acid sequences. The OR dataset contained sequences identified in this study together with sequences previously identified in *S. littoralis* (Walker et al. 2019; Koutroumpa et al . in prep), *Helicoverpa armigera* (Pearce et al. 2017) and *Bombyx mori* (Nakagawa et al. 2005, Anderson et al. 2009, Tanaka et al. 2009). The GR dataset contained sequences from *S. littoralis*, *S. litura* (Cheng et al. 2017) and *B. mori* (Guo et al. 2017). The IR dataset contained sequences from *S. littoralis*, *H. armigera* (Liu et al. 2018) and *B. mori* (Croset et al. 2010), plus sequences from *D. melanogaster*, *Apis mellifera* and

Tribolium castaneum (Croset et al. 2010). Sequences were aligned using Muscle (Edgar 2004) as implemented in Seaview v4.7 (Gouy et al. 2010). Maximum-likelihood phylogenies were built using PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010), after having determined the best-fit model of evolution with SMS (Lefort et al. 2017) Node support was estimated by approximate likelihood-ratio tests (Anisimova and Gascuel 2006). The trees were edited in FigTree v1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Heterologous expression of SlitORs in Drosophila

Full-length open reading frames of the candidate *S. littoralis* ORs (further referred to as *SlitOrs*) were synthesized *in vitro* and subcloned into the pUAST.attB vector by Synbio Technologies (Monmouth Junction, NJ, USA). Transformant *Drosophila* lines were generated by BestGene Inc. (Chino Hills, CA, USA), using the PhiC31 integrase system. *pUAST.attB-SlitOr* plasmids were injected into embryos with the genotype *y1 M{vas-int.Dm}ZH-2A w**; *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb*, leading to a targeted insertion of the *UAS-SlitOr* constructs into the third chromosome. The *UAS-SlitOr* lines were then crossed to lines carrying the *Δhalo* deletion and the *Or22a-Gal4* construct to generate flies with the genotype *w; Δhalo; UAS-SlitOr/Or22a-Gal4*, which expressed one *SlitOr* transgene in ab3A OSNs instead of the *Drosophila Or22a* gene. Flies were reared on standard cornmeal-yeast-agar medium at 25°C under a 12 h light: 12 h dark cycle.

Single-sensillum recordings of Drosophila OSNs

Action potentials from ab3A OSNs expressing one SlitOR were recorded using single-sensillum recordings on 2- to 8-day old flies, as previously described (de Fouchier et al. 2015). Stimulus cartridges consisted of Pasteur pipettes containing a 1 cm^2 filter paper loaded with 10 µl of the odorant solution (10^{-2} dilution in paraffin oil). Odorant stimulations lasted for 500 ms (air pulse 0.6 $L.min^{-1}$). OSN responses (in $spikes.s^{-1}$) were calculated by subtracting the spontaneous firing rate from the firing rate during the odorant stimulation. The time windows used to measure these two firing rates lasted for 500 ms and were respectively placed 500 ms before and 100 ms after the onset of stimulation.

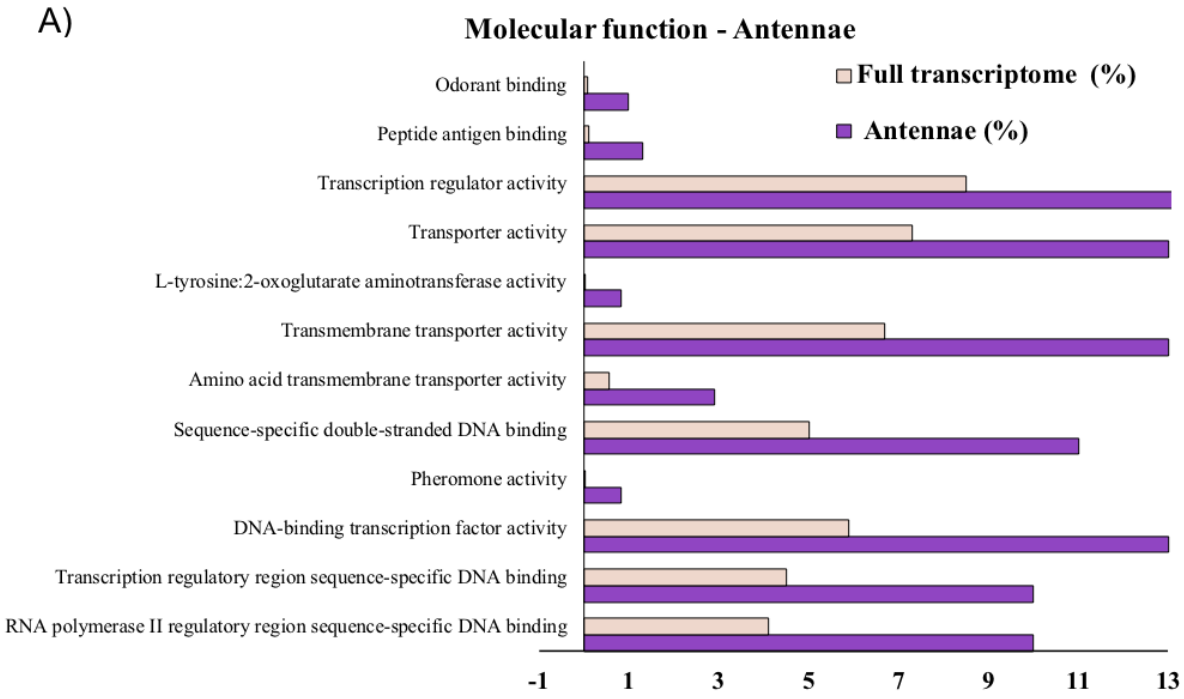
The absence of the endogenous receptor OR22a in ab3A OSNs was verified using ethyl hexanoate (10^{-4} dilution) as a stimulus. Then, the response spectrum of SlitORs was established using a panel of 30 diverse ligands, including aromatics, terpenes, and aliphatics (including pheromone compounds). The stimulus cartridges were used at most two times per fly and a maximum of eight times in total. The entire panel of molecules was tested seven times on seven different flies. Odorants were considered as active if the response they elicited was statistically different from the response elicited by the solvent alone ($P<0.05$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett's post hoc test).

RESULTS

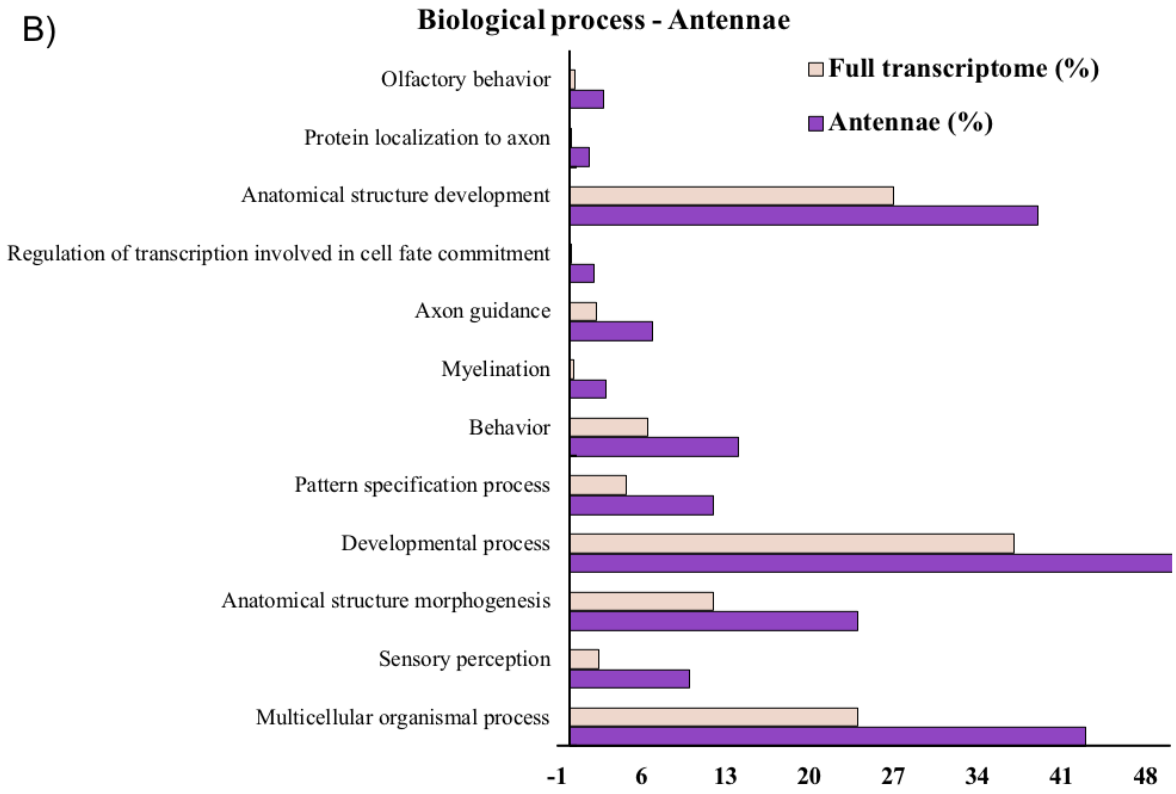
RNAseq, transcriptome assembly and annotation of chemosensory receptor genes

On average, each RNAseq library generated 63-75 million reads (Supp. data 1). All reads were used for a *de novo* larval chemosensory transcriptome assembly consisting of 284,318 transcripts. After removing transcripts with no aligned reads and redundant sequences, we obtained a total of 184,452 transcripts, out of which 44,604 contained a coding region with a minimum length of 100 base pairs. The BUSCO analysis retrieved 98.6% of the 1658 genes of the Insecta odb9 dataset, revealing that we generated a good representative transcriptome quality (Supp. data 2). As we sequenced independently RNA from the two major larval chemosensory organs (antennae and maxillae), we could perform GO enrichment tests. This revealed that antennae samples were enriched in GO terms such as "odorant binding", "olfactory behavior", and "sensory perception" compared to the whole transcriptome, in accordance with a role in olfaction. The maxillae samples were enriched in GO terms including "taste receptor binding" (Figure 1).

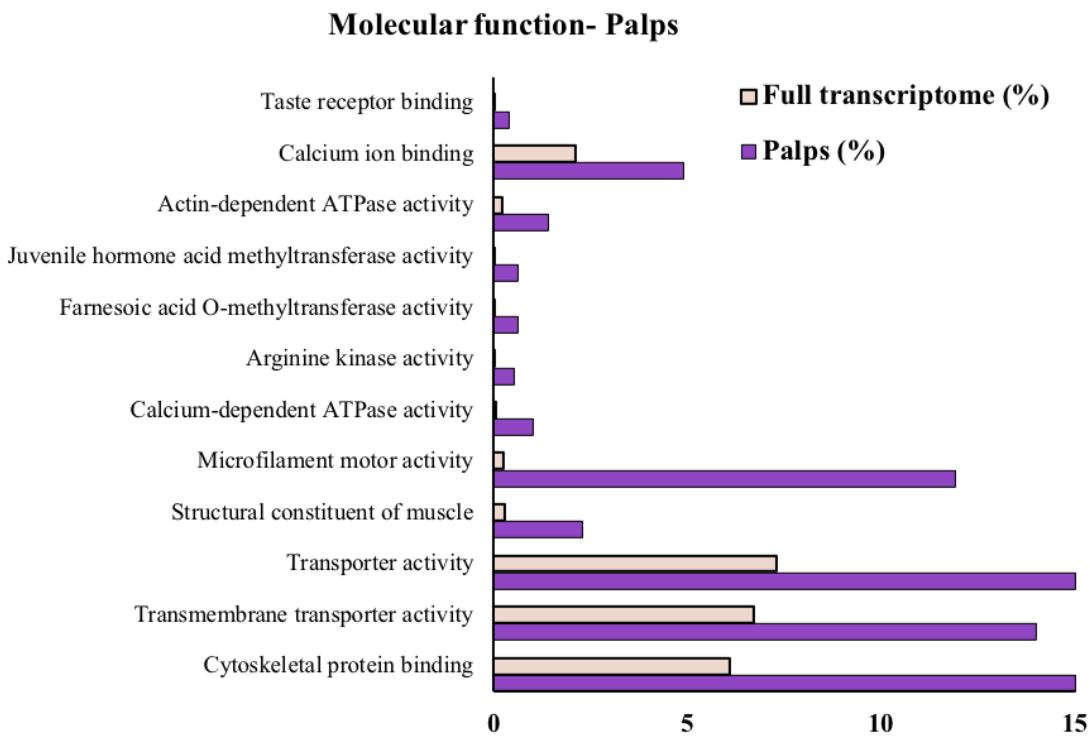
Searching the transcriptome assembly, we identified a total of 175 candidate chemosensory genes: 46 OBPs, 22 CSPs, 2 SNMPs, 44 ORs, 38 GRs and 23 IRs. Looking at binding proteins (OBPs and CSPs), we retrieved in the larval transcriptome all the 22 previously described CSPs and 44 out of 51 OBPs described, and we identified two new OBPs that we named as OBP46 and OBP47. In addition to the 35 larval chemosensory receptors (ORs, GRs, IRs) previously described (Poivet et al. 2013), we identified 70 more expressed in larvae. More importantly, we annotated 37 chemosensory receptor genes (5 ORs, 23 GRs, and 9 IRs) that have not been described previously in *S. littoralis* transcriptomes, neither in adults nor in larvae. We named them according to the closest homologues in other species and to their phylogenetic position.



B)


Biological process - Antennae
Full transcriptome (%)
Antennae (%)
Olfactory behavior
Protein localization to axon
Anatomical structure development
Regulation of transcription involved in cell fate commitment
Axon guidance
Myelination
Behavior
Pattern specification process
Developmental process
Anatomical structure morphogenesis
Sensory perception
Multicellular organismal process
-1
6
13
20
27
34
41
48

C)


Molecular function- Palps
Full transcriptome (%)
Palps (%)
Taste receptor binding
Calcium ion binding
Actin-dependent ATPase activity
Juvenile hormone acid methyltransferase activity
Farnesoic acid O-methyltransferase activity
Arginine kinase activity
Calcium-dependent ATPase activity
Microfilament motor activity
Structural constituent of muscle
Transporter activity
Transmembrane transporter activity
Cytoskeletal protein binding
0
5
10
15

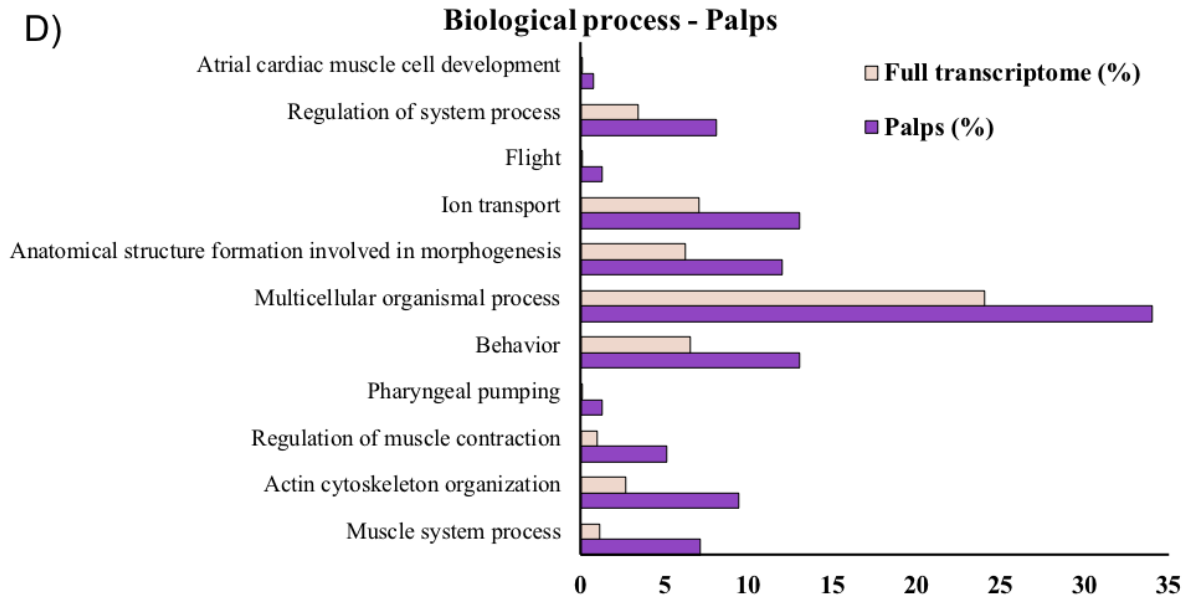


Figure 1. Gene ontology enrichments terms in the antenna and palps. The terms showed in the figures are those with the most significant p-value observed. **A, C)** Terms for Molecular function in the antennae and palps. **B, D)** Terms for Biological process in the antenna and palps.

Whereas only 22 OR transcripts have been previously described in *S. littoralis* caterpillar antennae and maxillae (Poivet et al. 2013), we identified here twice this number, with a total of 44. Among them, five encoded previously unknown candidate *S. littoralis* ORs (SlitOR63, 64, 66, 67 and 69). The phylogenetic analysis showed that the 44 larval ORs were distributed across all the Lepidoptera OR lineages (Figure 2), including some clades which have been assigned a putative function (de Fouchier et al. 2017), such as receptors for aromatic compounds and pheromone receptors.

We annotated 38 GR transcripts in the larval transcriptome, which represents the largest set of GRs described for this species, including 23 new putative GRs. Larval tissues express the three candidate CO_2 receptors, the candidate fructose receptor and three out of the six known adult candidate sugar receptors (Figure 3). All the newly identified SlitGRs belong to the reaminging lineage in the phylogeny, usually referred to as the candidate bitter receptors.

We identified 23 IRs expressed in the larval transcriptome, including the three candidate co-receptors IR25a, IR8a and IR76b. Among them, nine IRs have never been reported in *S. littoralis*, out of which eight belong to the lineage of candidate gustatory IRs and one (SlitIR75p.1) to the clade of olfactory-related IRs (Figure 4).

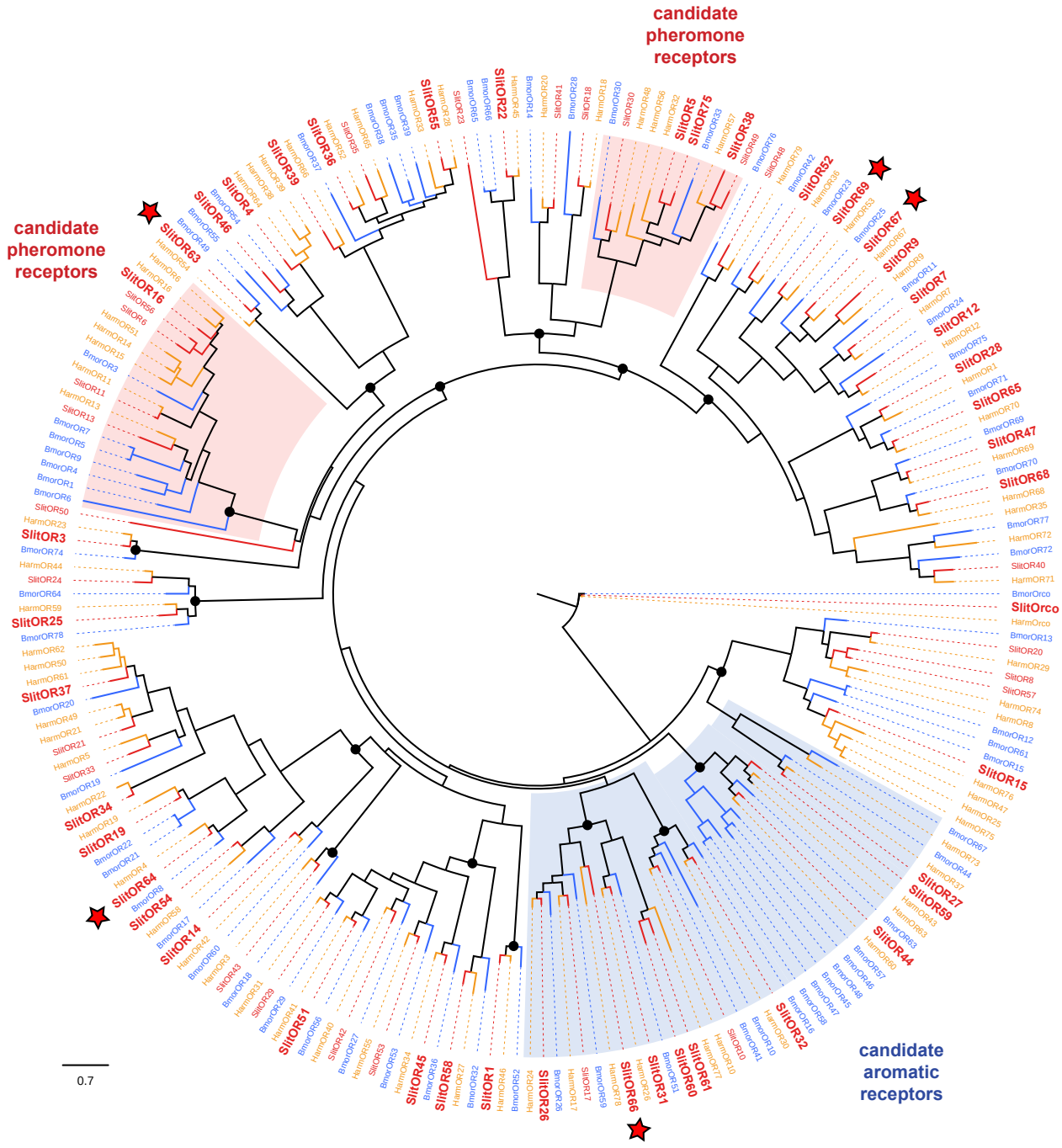


Figure 2. Maximum-likelihood phylogeny of Lepidopteran ORs. The tree was built from an alignment of OR sequences from *S. littoralis* (Slit, red), *B. mori* (Bmor, blue) and *H. armigera* (Harm, orange). Receptors found expressed in the larvae are in bold red, new SlitORs found on this transcriptome are indicated with a red star. Black circles indicate nodes supported by a aLRT value >0.9.

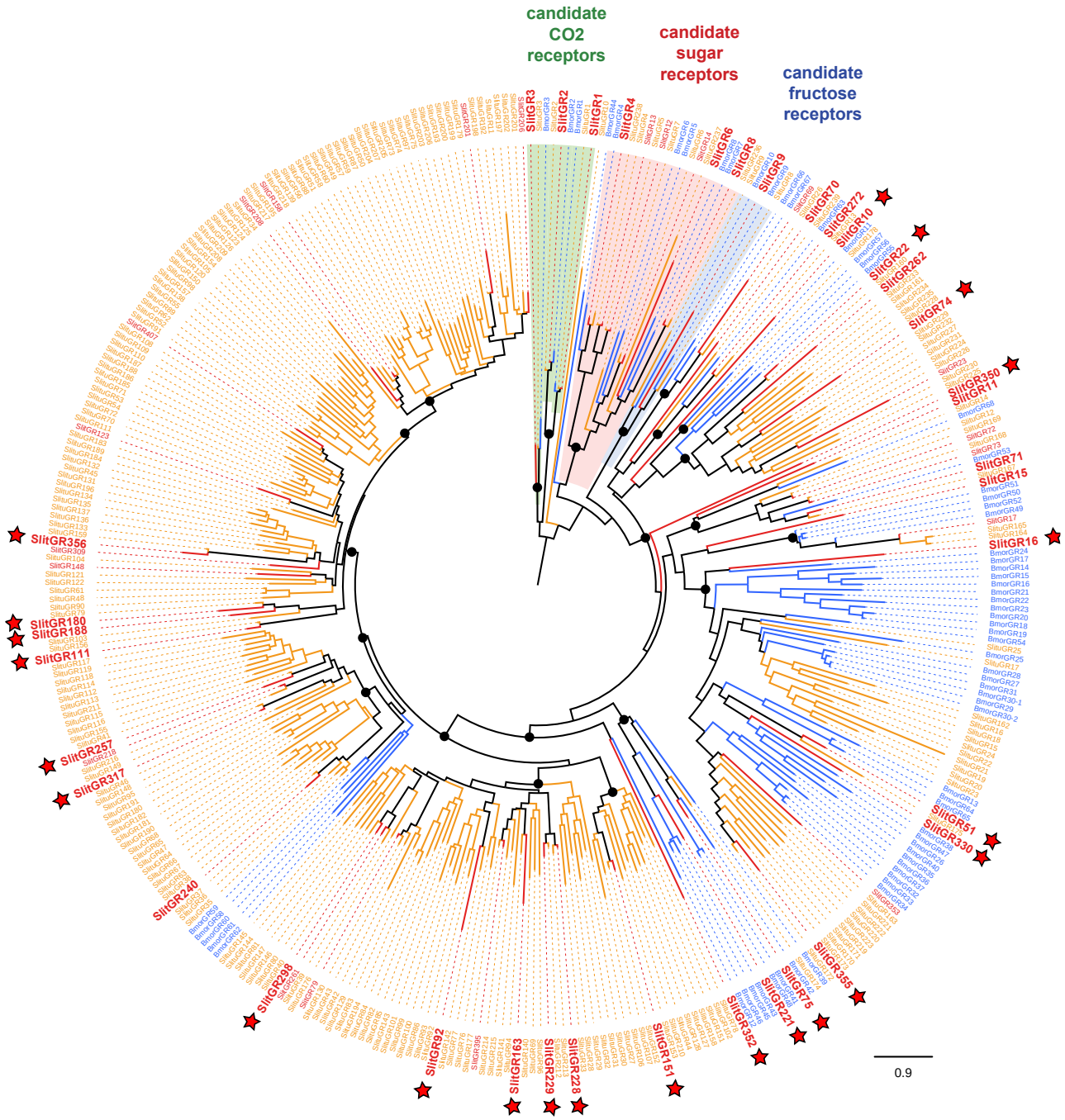


Figure 3. Maximum-likelihood phylogeny of Lepidopteran GRs. The tree was built from an alignment of GR sequences from *S. littoralis* (Slit, red), *B. mori* (Bmor, blue) and *S. litura* (Slitu, orange). Receptors found expressed in the larvae are in bold red, new SlitGRs found on this transcriptome are indicated with a red star. Black dots indicate nodes supported by a aLRT value >0.9.

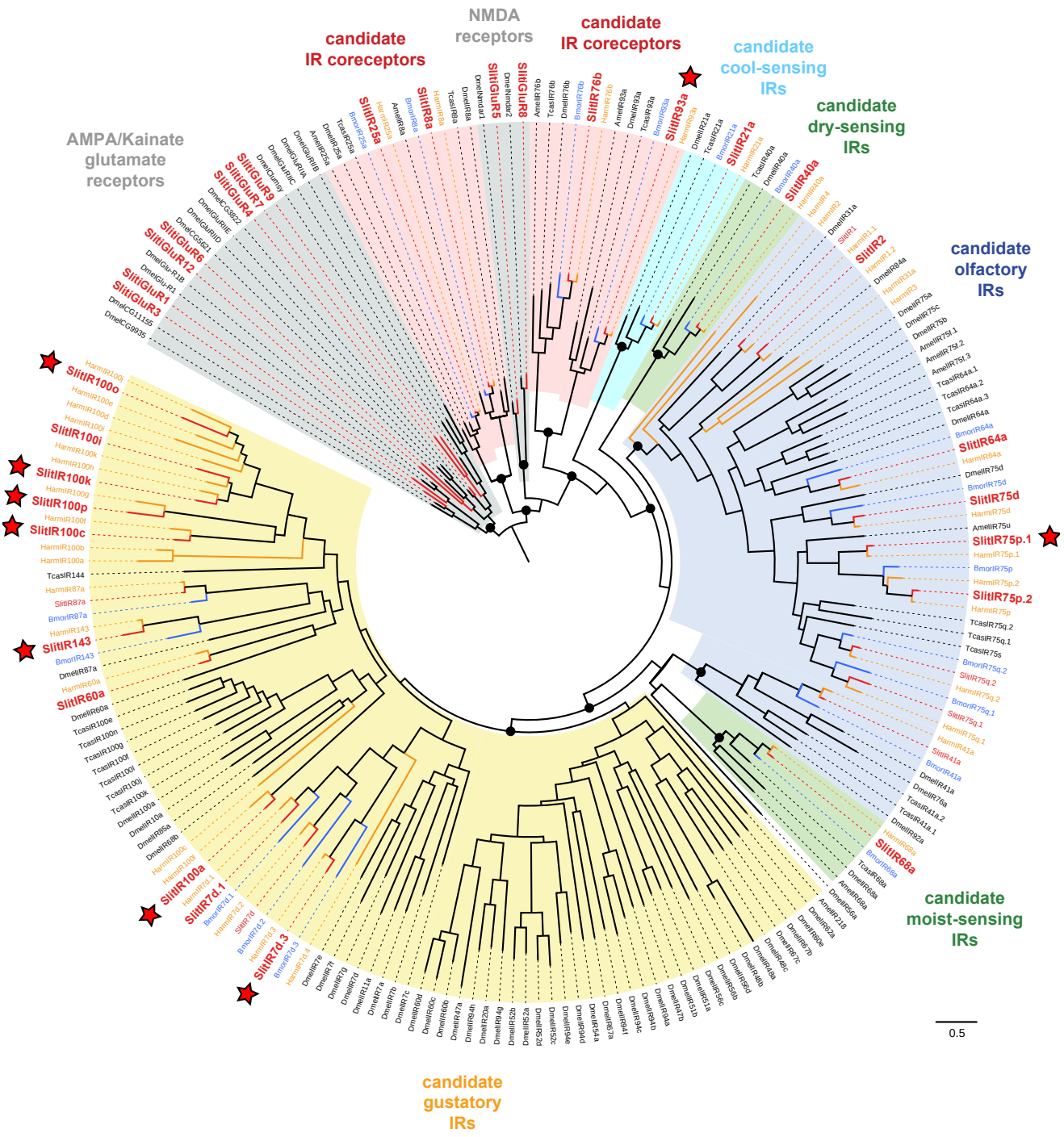


Figure 4. Maximum-likelihood phylogeny of insect IRs. The tree was built from an alignment of IR sequences from *S. littoralis* (Slit, red), *B. mori* (Bmor, blue), *H. armigera* (Harm, orange), *D. melanogaster* (Dmel), *Apis mellifera* (Amell) and *Tribolium castaneum* (Tcas). Receptors found expressed in the larvae are in bold red, new SlitIRs found on this transcriptome are indicated with a red star. Black dots indicate nodes supported by a aLRT value >0.9.

Differential expression of chemosensory receptor genes in larval antennae and maxillae.
Since both antennae and maxillae participate in larvae chemosensation, we conducted a differential expression analysis between both tissues. Most of the OR transcripts appeared to be more expressed in antennae compared to maxillae: we notably found 30 ORs specifically expressed in antennae, and no maxillae-specific OR. Interestingly, the two most highly expressed ORs, SlitOR27 and SlitOR31, were expressed in both antennae and maxillae (Figure 5).

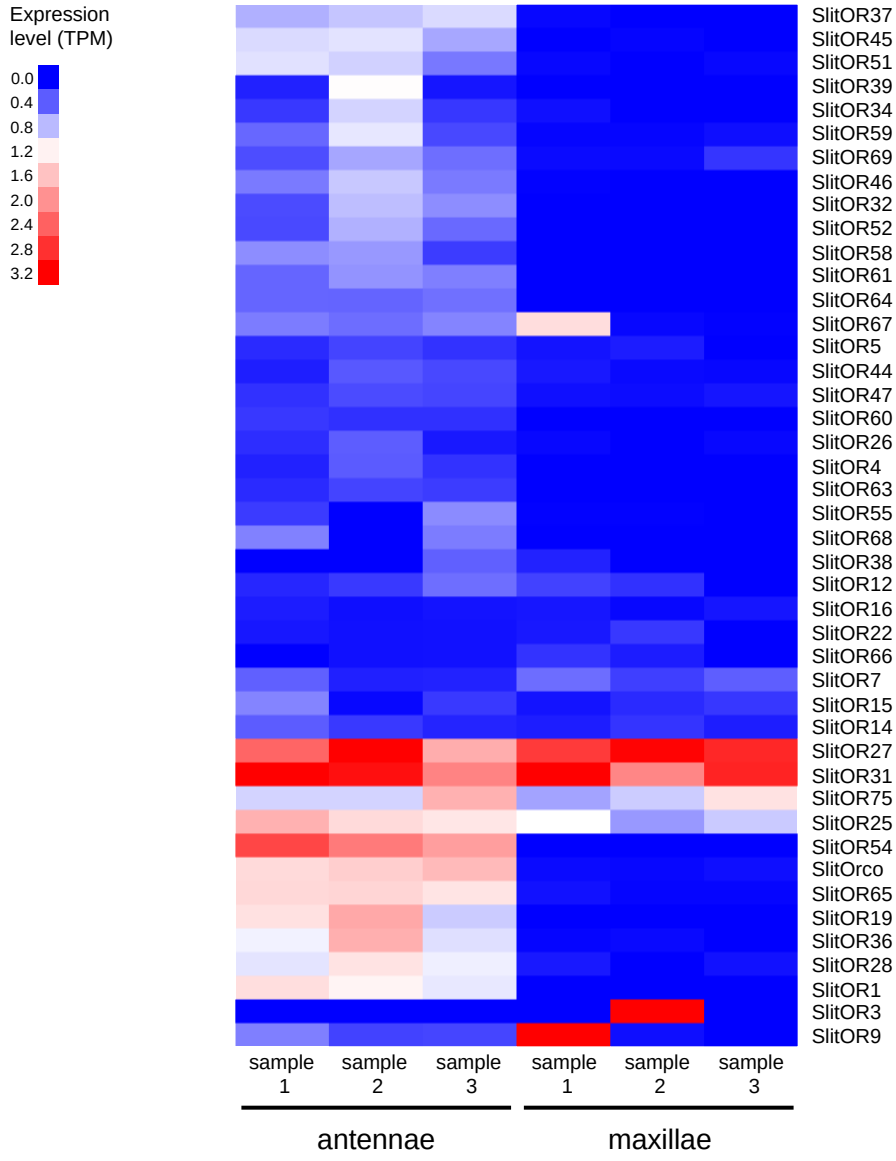


Figure 5. Heat map based on the TPM values (Transcripts Per Kilobase per Million) representing the expression levels of different SlitORs in the antennae and maxillae in three independent samples.

Regarding GRs, we found that expression levels were globally very low compared to the other chemosensory genes, as usually observed in Lepidoptera (Cheng et al. 2017, Guo et al. 2017). Eleven GRs presented a maxillae-biased expression and four GRs were over-expressed in the

antennae (Figure 6), in accordance with the GO enrichment analysis. Among them we found the three candidate CO_2 receptors, SlitGR1, 2 and 3. The two most expressed GRs found in both organs, SlitGR151 and SlitGR395, clustered in the “bitter GR” clade in the phylogeny (Figure 3).

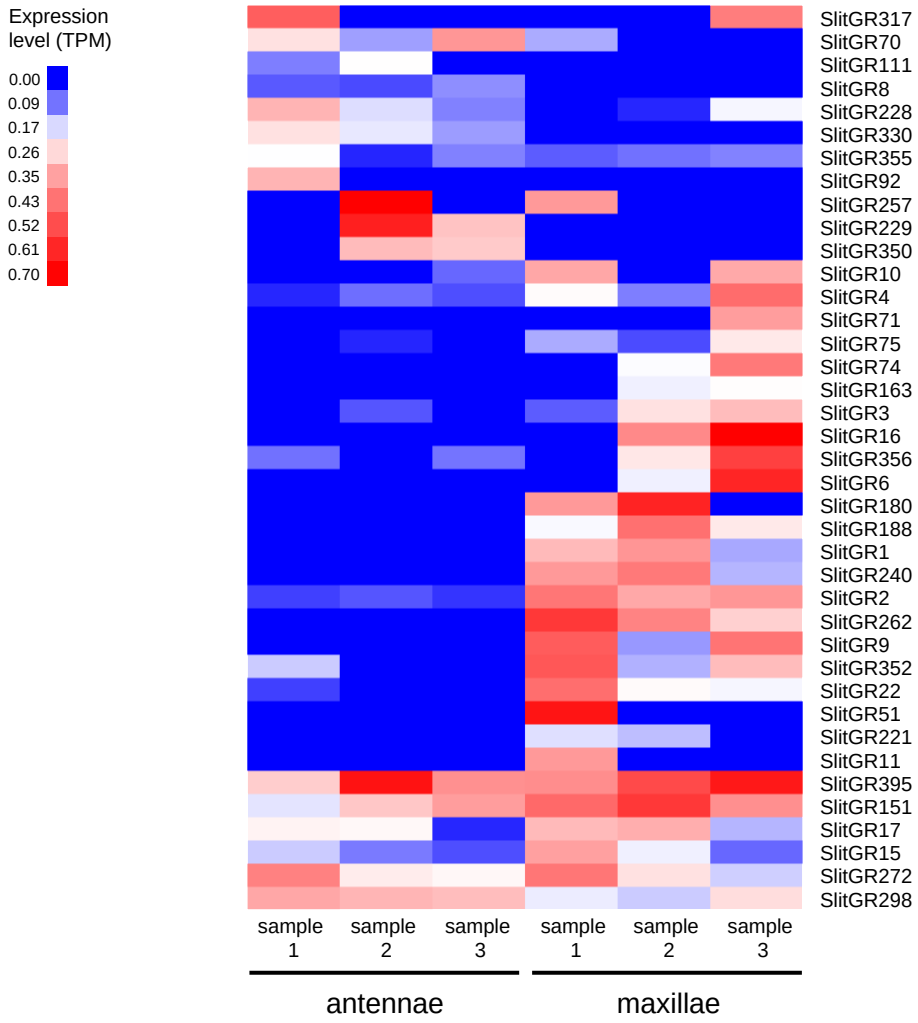


Figure 6. Heat map based on the TPM values (Transcripts Per Kilobase per Million) representing the expression levels of different SlitGRs in the antennae and maxillae in three independent samples.

IR76b and IR25a were found to be the most expressed IRs in larvae antennae and maxillae (Figure 7), as expected for IR co-receptors. The other putative co-receptor IR8a presented an antennae-biased expression. Five other IRs putatively involved in olfaction, moist and cool sensing were also among the most expressed. Among the 23 IRs identified in this work, three were antennae-enriched (IR75p.1, IR75d, IR100o) and three others were maxillae-enriched (IR7d.3, IR100c, 100a).

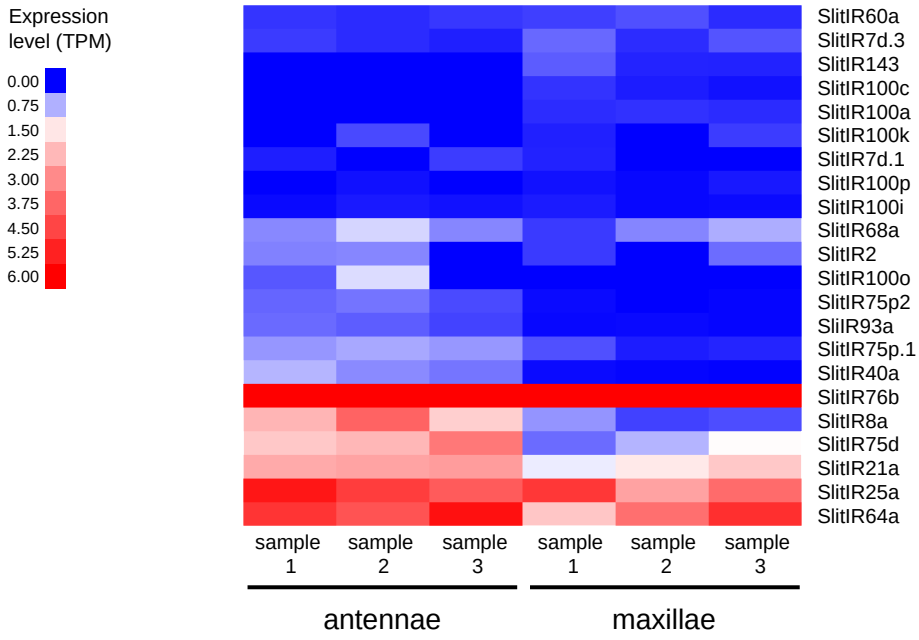


Figure 7. Heat map based on the TPM values (Transcripts Per Kilobase per Million) representing the expression levels of different SlitIRs in the antennae and maxillae in three independent samples.

Functional characterization of larval odorant receptors

The five larval candidate ORs that were not identified in previous transcriptomes were expressed in the *Drosophila* empty neuron system (Dobritsa et al. 2003) for functional characterization. A panel of 30 odorant molecules were tested on the flies expressing these SlitORs, including compounds that activated other already deorphanized receptors (de Fouchier et al. 2017) and chemically diverse compounds that have been proven to affect the larvae behavior, including the main component of the sex pheromone blend of this species (Poivet et al. 2012). Two out of the five ORs (SlitOR61 and SlitOR66) were successfully deorphanized. The remaining larval ORs did not responded to any odorants from the panel we used. *Drosophila* OSNs expressing SlitOR61 revealed a broadly tuned response profile to the tested odor panel, with significant responses to several terpenes, aliphatic and aromatic compounds (Figure 8A). The best ligand was 1,8 cineole, a monoterpene also known as eucalyptol. SlitOR66 appeared more narrowly tuned to aromatic compounds, since significant responses were observed only for methyl benzoate, methyl salicylate and acetophenone (Figure 8B).

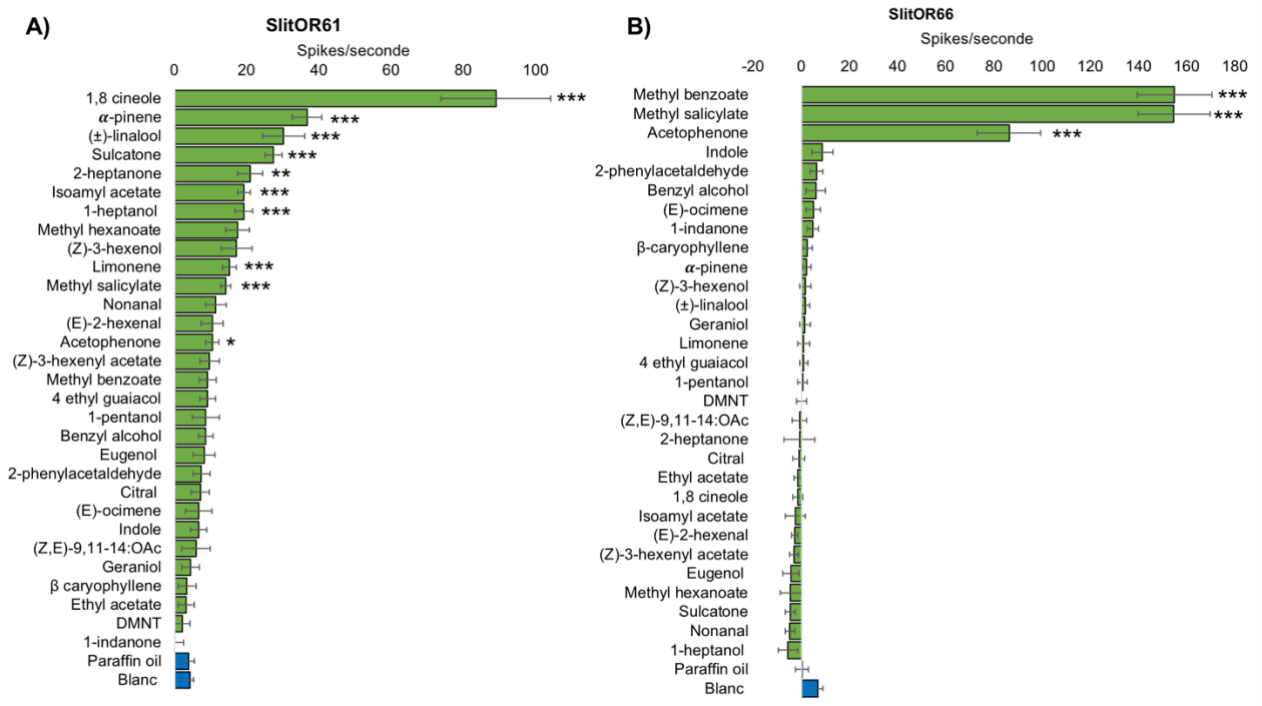


Figure 8. SlitOR response spectra for two newly identified receptors from the transcriptome (this study). Receptors were expressed in Drosophila ab3 sensilla using the empty neuron system and single sensillum recording (Dobritsa et al. 2003). **A)** Responses from ab3A neurons expressing SlitOR61. **B)** Responses from ab3A neurons expressing SlitOR66. Responses are presented ± s.e.m. Blue bars: controls (paraffin oil solvent, blank). Green bars: panel of 30 diverse molecules tested at 10^{-2} dilutions. Asterisks indicate statistically significant differences between responses to the odorant and to the solvent (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, $n = 10$).

DISCUSSION

In this study, we have not only more than doubled the number of chemosensory genes known to be expressed in polyphagous caterpillars of the cotton leafworm *S. littoralis*, but we have also identified 39 new chemosensory transcripts never described in this herbivorous model species. These advances rely on the deep sequencing we conducted compared to previous studies, allowing identification of low expressed genes, a hallmark of most chemosensory receptors. More importantly, we evidenced potential caterpillar-specific OR, GR, IR and OBP transcripts that were not identified in previous transcriptomes (Legeai et al. 2011, Jacquin-Joly et al. 2012, Poivet et al. 2013, Walker et al. 2019; Koutroumpa et al. in prep). Caterpillars possess two main chemosensory organs that consists of antennae and maxillary palps, containing 78 OSNs in total (Schoonhoven and Dethier 1966, Dethier and Schoonhoven 1969). Although this number of OSNs is much lower than in adult moths (which harbour thousands of OSNs in their antennae), caterpillars express a

relatively large set ORs, most presenting an antennal-biased expression. Exceptions consisted in the two most highly expressed ORs that were found in both antennae and maxillae: SlitOR27 and SlitOR31. Both have been previously functionally characterized (de Fouchier et al. 2017) and they are extremely sensitive and specific to indole (an herbivore-induced volatile in cotton, Zakir et al. 2013) and eugenol (present in larval frass, Anderson et al. 1993), respectively. These volatiles have been reported to be part of oviposition-deterrent blends, and eugenol has been shown to be repellent for *S. littoralis* caterpillars (Anderson et al. 1993, Rharrabe et al. 2014). The high expression of SlitOR27 and SlitOR31 in larvae chemosensory organs suggests an important role of these volatiles, maybe allowing them to avoid occupied food sources. Among other functionally characterized adult ORs that are also expressed in larval antennae, we identified SlitOR19, tuned to indanone (present in larval frass), SlitOR25 tuned to numerous aromatics and SlitOR28 tuned to (*Z*)-3-hexenyl acetate (another herbivore-induced volatile in cotton). Similarly, these ORs may be important for larvae to detect conspecifics and damaged hosts. We do not have yet functional data for other highly expressed larval ORs, such as SlitOR1, 36, 54, 65, but the SlitOR36 homologue in *H. armigera* (HarmOR52) is tuned to 1-pentanol, which is attractive for larvae (Di et al. 2017a). Although at a low level, we detected the expression in larvae antennae of SlitOR5, the receptor specifically tuned to the major component of the sex pheromone blend of *S. littoralis*, (*Z,E*)-9,11-14:OAc (Bastin-Héline et al. 2019). It has been shown previously that larvae from this species do indeed detect and are attracted to this pheromone component (Poivet et al. 2012). The identification of SlitOR5 in the larval transcriptome suggests that larvae and adults use the same receptor to detect this pheromone. We also identified five OR-encoding transcripts not yet described in any of the published adult transcriptomes, suggesting they may be larvae-specific, and two ORs previously identified only in adult gustatory tissues (Koutroumpa et al. in prep). In the same range, five larvae-specific ORs have been previously identified in the silkworm moth *Bombyx mori* (Tanaka et al. 2009). These *S. littoralis* ORs presented an antennal biased expression and belong to different clades in the Lepidoptera OR phylogeny. Since they may recognize olfactory cues important for the foraging behavior of caterpillars, we expressed them in the *Drosophila* empty neuron system for functional characterization (Dobritsa et al. 2003). We could find ligands for two of these ORs, SlitOR61 and SlitOR66, using a stimulation panel of 30 odorants that included aromatics, terpenes and aliphatics. The most potent ligand for SlitOR66 was eucalyptol (1,8-cineole), a monoterpene known to act as a repellent in several insect species, including Lepidoptera (Durden et al. 2011, Koul et al. 2013, Kovanci 2016), Diptera (Klocke et al. 1987, Maciel et al. 2010), Blattodea (Scriven and Meloan 1984), Hemiptera and Coleoptera (Tripathi et al. 2001, Mareggiani et al. 2008, Abbasipour et al. 2011) with insecticide properties. Minor ligands included other terpenes, such as α-pinene, linalool and sulcatone and some aliphatics and aromatics commonly present in plants. SlitOR66 was narrowly tuned to three aromatics: methyl salicylate, methyl benzoate (emitted by damaged cotton plants) and acetophenone (found in larval frass). Here again, we can speculate that larvae use SlitOR66 to detect repellent cues. Surprisingly, the response profile of SlitOR66 mirrored that of a previously characterized OR expressed in adult antennae, SlitOR17 (de Fouchier et al. 2017), which was not found expressed in larval chemosensory tissues. This suggests that caterpillars and moths may use different ORs to detect the same cues.

Interestingly, SlitOR61 and 66 both belong to the lineage of candidate aromatic receptors, as defined by de Fouchier et al. (2017). Whereas SlitOR66 is indeed an aromatic receptor, the

observation that the best ligand of OR61 is a terpene shows that exceptions occur. The very long branch leading to SlitOR61 in the phylogeny (Figure 2) suggests a particularly high evolutionary rate, which could explain this functional divergence.

Taste is another modality used by caterpillars to choose food. Here, we found 38 putative GRs expressed, mainly in maxillae, a much higher number compared to the 3 GRs previously reported in a former *S. littoralis* larval transcriptome (Poivet et al. 2013), and is in the range of what has been described in the larval maxillae of *B. mori* (46 GRs expressed, Guo et al. (2017). However, this remains low compared to the numbers of GR genes annotated in the genomes of noctuid species, such as *S. litura* (237 GRs, Cheng et al. 2017), the fall armyworm *S. frugiperd*a (232 GRs, Gouin et al. 2017) and the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (197 GRs, Pearce et al. 2017). Whereas the discovery of such a high number of GR genes in these polyphagous species compared to monophagous/oligophagous species led to the hypothesis that GR expansions would be linked to polyphagy, only few studies investigated whether these GR genes are indeed expressed. In *S. litura*, only 109 of the predicted 237 GR genes were shown to be expressed in different chemosensory organs, mainly adult proboscis and larvae maxillae, but also larval legs and midgut (Cheng et al. 2017). A recent study conducted on adult *S. littoralis* chemosensory organs, including proboscis, labial palps and legs, revealed 34 GR genes expressed, 12 overlapping with the larval GRs identified here (Koutroumpa et al. in prep). Further deep investigation of GR expression in all tissues, as conducted in *S. litura* (Cheng et al. 2017), will reveal how many GRs are indeed expressed in *S. littoralis* tissues. Larval *S. littoralis* GRs identified here include the three Lepidoptera candidate CO_2 receptors, all being enriched in maxillae (revealing that larvae use these organs rather than antennae to detect this cue), and four candidate fructose or sugar receptors. However, the vast majority are candidate bitter receptors, which are believed to play an important role in feeding behaviors. IRs constitute the third family of insect chemosensory receptors. They are involved in both olfaction and taste, detecting acids and amines, but also thermo-sensation and hygro-sensation (Enjin et al. 2016, Knecht et al. 2016, 2017, Ni et al. 2016). We identified in the present study 23 putative IRs expressed in larvae, whereas only 17 could be identified in a former larvae transcriptome (Poivet et al. 2013). Taking together all former transcriptomic studies on adult and larvae, we annotated 7 new *S. littoralis* IRs. Based on the IR phylogenetic tree (Figure 4), we identified the 3 putative IR-coreceptors, 2 moist-sensing receptors, 2 olfactory-related receptors and 1 cool-sensing receptor. Most functional studies, however, have been conducted in *Drosophila* (Enjin et al. 2016, Hussain et al. 2016, Knecht et al. 2016), and information on IR function in lepidopteran species remains scarce. One recent study demonstrated that the coreceptor IR8a in *M. sexta* is necessary for detecting and avoiding acids from larval frass, so that females prefer to oviposit in a place where larvae conspecifics are absent (Zhang et al. 2019). In *H. armigera* mated females, IR1.2 and 75d were upregulated in the antenna compared to males (with no difference observed between unmated adults of both sexes), suggesting these IRs may play a role in oviposition host-seeking behavior (Liu et al. 2018). Apart the chemosensory receptor families described upper, other chemosensory gene families have been described to be important for insect chemosensation. In lepidopteran species, OBPs are classified in subgroups: the Pheromone-Binding Proteins (PBPs), associated with sex pheromone-specific trichoid sensilla, and the General Odorant-Binding Proteins (GOBPs), associated with plant volatile basiconic sensilla (Vogt et al.

1991). We have identified a total of 46 OBPs, including previously described GOBPs and PBPs, plus two new putative OBPs. The presence of two GOBPs in the larvae would potentially contribute to located the best host plant and thus target the best food source. These genes were also found in other species like *B. mori*, *M. sexta*, *H. melpomene* and *Danaus plexipus*, and only GOBP1 was reported in *S. littoralis* in a previous study (Poivet et al. 2013). We confirmed the expression of PBPs in larvae chemosensory organs as reported by Poivet et al 2012, as part of the sex pheromone sensory pathway. The information so far available for CSPs suggests they would act as general carrier of hydrophobic molecules rather than being specifically involved in chemodetection (Iovinella et al. 2013, Pelosi et al. 2018). The number of genes encoding CSPs is highly variable according species (Pelosi et al. 2006). In *S. littoralis*, 18 CSPs have been reported in the previous larval transcriptome, and 21 CSPs in a recently published adult transcriptome (Poivet et al. 2013, Walker et al. 2019), for a total of 22 CSPs in this species. In the present study we identified that all the 22 putative CSPs are expressed in the larvae. Concerning the Sensory neuron membrane proteins (SNMPs) there are two types commonly expressed in insects; SNMP1 expressed generally in the antennae, and SNMP2 present in several organs including non-chemosensory organs such as the wings and legs (Zhang et al. 2013c, Liu et al. 2014b). These SNMPs are conserved among Lepidopteran species, they have been described in several moths species, including the present larvae transcriptome (Rogers et al. 1997, Forstner et al. 2008, Jin et al. 2008, Huang et al. 2016). They are implicated in pheromone sensitivity and probably in other still unknown functions (Benton et al. 2007).
Previous studies on *Heliothis virescens* larvae confirm the expression on SNMP1 in the antennae and the implication of this gene in the detection of pheromones (Zielonka et al. 2016).

CONCLUSION

We report here a deep transcriptome of larvae chemosensory organs in *S. littoralis* whose analyses completed the set of annotated chemosensory gene transcripts in this species. This will serve as a resource for future chemosensory and transcriptomic studies in this species and related ones. We also expand the number of deorphanized *S. littoralis* ORs, adding new data on larvae ORs. This allowed us to identify odorants as possible relevant cues for larvae, and further behavioral studies will assess their ecological relevance.

Acknowledgements

We thank Anthony Bretaudeau for bioinformatics support, Thomas Chertemps for assistance with NG-CHM Generator, Pascal Roskam and Philippe Touton for insect rearing. This work has been funded by INRAE, Sorbonne Université and the French National Research Agency (ANR-16-CE21-0002). GC-V received doctoral fellowships from BECAL and the National Council of Science and Technology of Paraguay.

Author Contributions

GC-V: Data curation, Investigation, Writing original draft; CM: Data curation, Investigation; ChM, M-CF: Data curation; EJ-J, NM: Conceptualization, Funding acquisition, Writing review & editing.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

Abbasipour, H., M. Mahmoudvand, F. Rastegar, and M. H. Hosseinpour. 2011. Fumigant Toxicity and Oviposition Deterrency of the Essential Oil from Cardamom, Elettaria cardamomum , Against Three Stored—product Insects . Journal of Insect Science 11:1–10.

Abuin, L., B. Bargeton, M. H. Ulbrich, E. Y. Isacoff, S. Kellenberger, and R. Benton. 2011. Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. Neuron 69:44–60.

Anderson, A. R., K. W. Wanner, S. C. Trowell, C. G. Warr, E. Jaquin-Joly, P. Zagatti, H. Robertson, and R. D. Newcomb. 2009. Molecular basis of female-specific odorant responses in Bombyx mori. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39:189–197.

Anderson, P., M. Hilker, B. S. Hansson, S. Bombosch, B. Klein, and H. Schildknecht. 1993. Oviposition deterring components in larval frass of Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae): A behavioural and electrophysiological evaluation. Journal of Insect Physiology 39:129–137.

Anisimova, M., and O. Gascuel. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Systematic Biology 55:539–552.

Bastin-Héline, L., A. de Fouchier, S. Cao, F. Koutroumpa, G. Caballero-Vidal, S. Robakiewicz, C. Monsempes, M.-C. François, T. Ribeyre, A. Maria, T. Chertemps, A. de Cian, W. B. Walker, G. Wang, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2019. A novel lineage of candidate pheromone receptors for sex communication in moths. eLife 8:707174.

Benton, R., S. Sachse, S. W. Michnick, and L. B. Vosshall. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. PLoS Biology 4:240–257.

Benton, R., K. S. Vannice, and L. B. Vosshall. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in Drosophila. Nature 450:289–293.

Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114–2120.

Brand, P., H. M. Robertson, W. Lin, R. Pothula, W. E. Klingeman, J. L. Jurat-Fuentes, and B. R. Johnson. 2018. The origin of the odorant receptor gene family in insects. eLife 7:1–13.

Butterwick, J. A., J. del Mármol, K. H. Kim, M. A. Kahlson, J. A. Rogow, T. Walz, and V. Ruta. 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. Nature 560:447–452.

Chang, H., D. Ai, J. Zhang, S. Dong, Y. Liu, and G. Wang. 2017. Candidate odorant binding proteins and chemosensory proteins in the larval chemosensory tissues of two closely related noctuidae moths, Helicoverpa armigera and H. assulta. PLoS ONE 12.

Cheng, T., J. Wu, Y. Wu, R. V. Chilukuri, L. Huang, K. Yamamoto, L. Feng, W. Li, Z. Chen, H. Guo, J. Liu, S. Li, X. Wang, L. Peng, D. Liu, Y. Guo, B. Fu, Z. Li, C. Liu, Y. Chen, A. Tomar, F. Hilliou, N. Montagné, E. Jacquin-Joly, E. D'Alençon, R. K. Seth, R. K. Bhatnagar, A. Jouraku, T. Shiotsuki, K. Kadono-Okuda, A. Promboon, G. Smagghe, K. P. Arunkumar, H. Kishino, M. R. Goldsmith, Q. Feng, Q. Xia, and K. Mita. 2017. Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. Nature Ecology and Evolution 1:1747–1756.

Clavijo McCormick, A., E. Grosse-Wilde, D. Wheeler, M. C. Mescher, B. S. Hansson, and C. M. De Moraes. 2017. Comparing the Expression of Olfaction-Related Genes in Gypsy Moth (Lymantria dispar) Adult Females and Larvae from One Flightless and Two Flight-Capable Populations. Frontiers in Ecology and Evolution 5:1–19.

Conesa, A., S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón, and M. Robles. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21:3674–3676.

Couto, A., M. Alenius, and B. J. Dickson. 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the Drosophila olfactory system. Current Biology 15:1535–1547.

Croset, V., R. Rytz, S. F. Cummins, A. Budd, D. Brawand, H. Kaessmann, T. J. Gibson, and R. Benton. 2010. Ancient Protostome Origin of Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors and the Evolution of Insect Taste and Olfaction. PLoS Genetics 6:e1001064.

Dethier, V. ., and L. M. Schoonhoven. 1969. Olfactory coding by lepidopterous larvae. Entomologia Experimentalis et Applicata 12:535–543.

Di, C., C. Ning, L.-Q. Huang, and C.-Z. Wang. 2017. Design of larval chemical attractants based on odorant response spectra of olfactory receptors in the cotton bollworm. Insect Biochemistry and Molecular Biology.

Dobritsa, A. A., W. van der Goes van Naters, C. G. Warr, R. A. Steinbrecht, and J. R. Carlson. 2003. Integrating the Molecular and Cellular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Neuron 37:827–841.

Durden, K., S. Sellars, B. Cowell, J. J. Brown, and M. A. Pszczolkowski. 2011. Artemisia annua extracts, artemisinin and 1,8-cineole, prevent fruit infestation by a major, cosmopolitan pest of apples.

Pharmaceutical Biology 49:563–568.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32:1792–1797.

Enjin, A., E. E. Zaharieva, D. D. Frank, S. Mansourian, G. S. B. Suh, M. Gallio, and M. C. Stensmyr. 2016. Humidity sensing in drosophila. Current Biology 26:1352–1358.

European Food Safety Authority. 2015. Scientific Opinion on the pest categorisation of Spodoptera littoralis. Page EFSA Journal.

Faria, D. 2017. GOSlimmer. GitHub repository.

Forstner, M., T. Gohl, I. Gondesen, K. Raming, H. Breer, and J. Krieger. 2008. Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. Chemical Senses 33:291–299.

de Fouchier, A., X. Sun, C. Monsempes, O. Mirabeau, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2015. Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus Spodoptera. Frontiers in Ecology and Evolution 3:1–11.

de Fouchier, A., W. B. Walker, N. Montagné, C. Steiner, M. Binyameen, F. Schlyter, T. Chertemps, A. Maria, M.-C. François, C. Monsempes, P. Anderson, B. S. Hansson, M. C. Larsson, and E. Jacquin-Joly. 2017. Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. Page 15709 Nature Communications.

Freeman, E. G., and A. Dahanukar. 2015. Molecular neurobiology of Drosophila taste. Current Opinion in Neurobiology 34:140–148.

Fu, L., B. Niu, Z. Zhu, S. Wu, and W. Li. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics 28:3150–3152.

Götz, S., J. M. García-Gómez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, M. Robles, M. Talón, J. Dopazo, and A. Conesa. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Research 36:3420–3435.

Gouin, A., A. Bretaudeau, K. Nam, S. Gimenez, J. M. Aury, B. Duvic, F. Hilliou, N. Durand, N. Montagné, I. Darboux, S. Kuwar, T. Chertemps, D. Siaussat, A. Bretschneider, Y. Moné, S. J. Ahn, S. Hänniger, A. S. G. Grenet, D. Neunemann, F. Maumus, I. Luyten, K. Labadie, W. Xu, F. Koutroumpa, J. M. Escoubas, A. Llopis, M. Maïbèche-Coisne, F. Salasc, A. Tomar, A. R. Anderson, S. A. Khan, P. Dumas, M. Orsucci, J. Guy, C. Belser, A. Alberti, B. Noel, A. Couloux, J. Mercier, S. Nidelet, E. Dubois, N. Y. Liu, I. Boulogne, O. Mirabeau, G. Le Goff, K. Gordon, J. Oakeshott, F. L. Consoli, A. N. Volkoff, H. W. Fescemyer, J. H. Marden, D. S. Luthe, S. Herrero, D. G. Heckel, P. Wincker, G. J. Kergoat, J. Amselem, H. Quesneville, A. T. Groot, E. Jacquin-Joly, N. Nègre, C. Lemaitre, F. Legeai, E. D'Alençon, and P. Fournier. 2017. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (Spodoptera frugiperda, Noctuidae) with different host-plant ranges. Scientific Reports 7:1–12.

Gouy, M., S. Guindon, and O. Gascuel. 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User

Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. Molecular Biology and Evolution 27:221–224.

Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B. W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, and A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature biotechnology 29:644–52.

Guindon, S., J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. Systematic Biology 59:307–321.

Guo, H., T. Cheng, Z. Chen, L. Jiang, Y. Guo, J. Liu, S. Li, K. Taniai, K. Asaoka, K. Kadono-Okuda, K. P. Arunkumar, J. Wu, H. Kishino, H. Zhang, R. K. Seth, K. P. Gopinathan, N. Montagné, E. Jacquin-Joly, M. R. Goldsmith, Q. Xia, and K. Mita. 2017. Expression map of a complete set of gustatory receptor genes in chemosensory organs of Bombyx mori. Insect Biochemistry and Molecular Biology 82:74–82.

Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. Macmanes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C. N. Dewey, R. Henschel, R. D. Leduc, N. Friedman, and A. Regev. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols 8:1494–1512.

Hallem, E. A., M. G. Ho, and J. R. Carlson. 2004. The Molecular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Cell 117:965–979.

Huang, X., L. Liu, Y. Fang, and J. Feng. 2016. Expression of a Sensory Neuron Membrane Protein SNMP2 in Olfactory Sensilla of Codling Moth Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology 109:1907–1913.

Hussain, A., M. Zhang, H. K. Üçpunar, T. Svensson, E. Quillery, N. Gompel, R. Ignell, and I. C. Grunwald Kadow. 2016. Ionotropic Chemosensory Receptors Mediate the Taste and Smell of Polyamines. PLoS Biology 14:1–30.

Iovinella, I., F. Bozza, B. Caputo, A. della Torre, and P. Pelosi. 2013. Ligand-binding study of Anopheles gambiae chemosensory proteins. Chemical Senses 38:409–419.

Jacquin-Joly, E., F. Legeai, N. Montagné, C. Monsempes, M.-C. François, J. Poulain, F. Gavory, W. B. Walker III, B. S. Hansson, and M. C. Larsson. 2012. Candidate chemosensory Genes in Female Antennae of the Noctuid Moth Spodoptera littoralis. International Journal of Biological Sciences 8:1036–1050.

Jin, X., S. H. Tal, and D. P. Smith. 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:10996–11001.

Klocke, J. A., M. V. Darlington, and M. F. Balandrin. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding

and ovipositional repellent from volatile oil of Hemizonia fitchii (Asteraceae). Journal of Chemical Ecology 13:2131–2141.

Knecht, Z. A., A. F. Silbering, J. Cruz, L. Yang, V. Croset, R. Benton, and P. A. Garrity. 2017. Ionotropic receptor-dependent moist and dry cells control hygrosensation in Drosophila. eLife 6:1–11.

Knecht, Z. A., A. F. Silbering, L. Ni, M. Klein, G. Budelli, R. Bell, L. Abuin, A. J. Ferrer, A. D. T. Samuel, R. Benton, and P. A. Garrity. 2016. Distinct combinations of variant ionotropic glutamate receptors mediate thermosensation and hygrosensation in drosophila. eLife 5:1–15.

Koul, O., R. Singh, B. Kaur, and D. Kanda. 2013. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of Helicoverpa armigera, Spodoptera litura and Chilo partellus. Industrial Crops and Products 49:428–436.

Kovanci, O. B. 2016. Feeding and oviposition deterrent activities of microencapsulated cardamomoleoresin and eucalyptol against Cydia pomonella. Chilean Journal of Agricultural Research 76:62–70.

Kreher, S. A., J. Y. Kwon, and J. R. Carlson. 2005. The molecular basis of odor coding in the Drosophila larva. Neuron 46:445–456.

Kwon, J. Y., A. Dahanukar, L. A. Weiss, and J. R. Carlson. 2007. The molecular basis of CO2 reception in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:3574–3578.

Langmead, B. 2010. Aligning Short Sequencing Reads with Bowtie. Current Protocols in Bioinformatics.

Larsson, M. C., A. I. Domingos, W. D. Jones, M. E. Chiappe, H. Amrein, and L. B. Vosshall. 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. Neuron 43:703–714.

Lefort, V., J.-E. Longueville, and O. Gascuel. 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. Molecular Biology and Evolution 34:2422–2424.

Legeai, F., S. Malpel, N. Montagné, C. Monsempes, F. Cousserans, C. Merlin, M. C. François, M. Maïbèche-Coisné, F. Gavory, J. Poulain, and E. Jacquin-Joly. 2011. An Expressed Sequence Tag collection from the male antennae of the Noctuid moth Spodoptera littoralis: A resource for olfactory and pheromone detection research. BMC Genomics 12:86.

Li, B., and C. N. Dewey. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC bioinformatics 12:323.

Liu, C., J. Zhang, Y. Liu, G. Wang, and S. Dong. 2014. Expression of SNMP1 and SNMP2 genes in antennal sensilla of Spodoptera exigua (Hübner). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 85:114–126.

Liu, N. Y., W. Xu, S. L. Dong, J. Y. Zhu, Y. X. Xu, and A. Anderson. 2018. Genome-wide analysis of ionotropic receptor gene repertoire in Lepidoptera with an emphasis on its functions of Helicoverpa armigera. Insect Biochemistry and Molecular Biology 99:37–53.

Liu, R., A. Z. Holik, S. Su, N. Jansz, K. Chen, H. S. Leong, M. E. Blewitt, M.-L. Asselin-Labat, G. K. Smyth, and M. E. Ritchie. 2015. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. Nucleic Acids Research 43:e97–e97.

Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15:550.

Maciel, M. V., S. M. Morais, C. M. L. Bevilaqua, R. A. Silva, R. S. Barros, R. N. Sousa, L. C. Sousa, E. S. Brito, and M. A. Souza-Neto. 2010. Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on Lutzomyia longipalpis. Veterinary Parasitology 167:1–7.

Mareggiani, G., S. Russo, and M. Rocca. 2008. Eucalyptus globulus (Mirtaceae) essential oil: efficacy against Aphis gossypii(Hemiptera: Aphididae), an agricultural pest. Rev Latinoamer Quím 1:1–6.

Montagné, N., A. de Fouchier, R. D. Newcomb, and E. Jacquin-Joly. 2015. Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. Progress in Molecular Biology and Translational Science 130:55–80.

Nakagawa, T., T. Sakurai, T. Nishioka, and K. Touhara. 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. Science 307:1638–1642.

Ni, L., M. Klein, K. V. Svec, G. Budelli, E. C. Chang, A. J. Ferrer, R. Benton, A. D. T. Samuel, and P. A. Garrity. 2016. The ionotropic receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in Drosophila. eLife 5:1–12.

Pearce, S., D. Clarke, P. East, S. Elfekih, K. Gordon, L. Jermiin, A. McGaughran, J. Oakeshott, A. Papanikolaou, O. P Perera, R. V Rane, S. Richards, W. Tek Tay, T. Walsh, A. Anderson, C. Anderson, S. Asgari, P. Board, A. Bretschneider, P. M Campbell, T. Chertemps, J. Christeller, C. Coppin, S. Downes, G. Duan, C. Farnsworth, R. Good, L.-B. Han, Y. Han, K. Hatje, I. Horne, Y. Huang, D. Hughes, E. Jacquin-Joly, W. James, S. Jhangiani, M. Kollmar, S. Kuwar, S. Li, N.-Y. Liu, M. Maibeche, J. Miller, N. Montagne, T. Perry, C. Qu, S. Song, G. Sutton, H. Vogel, B. Walenz, W. Xu, H.-J. Zhang, Z. Zou, P. Batterham, O. Edwards, R. Feyereisen, R. Gibbs, D. Heckel, A. McGrath, C. Robin, S. Scherer, K. Worley, and Y. Wu. 2017. Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive Helicoverpa pest species. Page Genome Biology.

Pelosi, P., I. Iovinella, J. Zhu, G. Wang, and F. R. Dani. 2018. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biological Reviews 93:184–200.

Pelosi, P., J. J. Zhou, L. P. Ban, and M. Calvello. 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. Cellular and Molecular Life Sciences 63:1658–1676.

Poitout, S., R. Bues, and C. Le Rumeur. 1972. Elevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton Earis insulana et Spodoptera littoralis. Entomologia Experimentalis et Applicata 15:341–350.

Poivet, E., A. Gallot, N. Montagné, N. Glaser, F. Legeai, and E. Jacquin-Joly. 2013. A Comparison of the Olfactory Gene Repertoires of Adults and Larvae in the Noctuid Moth Spodoptera littoralis. PLoS

ONE 8:e60263.

Poivet, E., K. Rharrabe, C. Monsempes, N. Glaser, D. Rochat, M. Renou, F. Marion-Poll, and E. Jacquin-Joly. 2012. The use of the sex pheromone as an evolutionary solution to food source selection in caterpillars. Nature Communications 3:1047.

Rharrabe, K., E. Jacquin-Joly, and F. Marion-Poll. 2014. Electrophysiological and behavioral responses of Spodoptera littoralis caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. Frontiers in Ecology and Evolution 2:5.

Rimal, S., and Y. Lee. 2018. The multidimensional ionotropic receptors of Drosophila melanogaster. Insect Molecular Biology 27:1–7.

Robertson, H. M. 2019. Molecular Evolution of the Major Arthropod Chemoreceptor Gene Families. Annual Review of Entomology 64:227–242.

Robertson, H. M., C. G. Warr, and J. R. Carlson. 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in Drosophila melanogaster. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:14537–14542.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140.

Rogers, M. E., M. Sun, M. R. Lerner, and R. G. Vogt. 1997. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth Antheraea polyphemus with homology to the CD36 family of membrane proteins. Journal of Biological Chemistry 272:14792–14799.

Salama, H. S., N. Z. Dimetry, and S. A. Salem. 1971. On the Host Preference and Biology of the Cotton Leaf Worm Spodoptera littoralis Bois. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 67:261–266.

Sato, K., M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L. B. Vosshall, and K. Touhara. 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. Nature 452:1002–6.

Schmieder, R., Y. W. Lim, and R. Edwards. 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. Bioinformatics 28:433–435.

Schoonhoven, L., and J. J. . Van Loon. 2002. An inventory of taste in caterpillars: Each species its own key. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 48:215–263.

Schoonhoven, L. M. 1987. What makes a caterpillar eat? The sensory codes underlying feeding behaviour. Advances in Chemoreception and Behavior:69–97.

Schoonhoven, L. M., and V. . Dethier. 1966. Sensory Aspects of Host-Plant Discrimination By Lepidopterous Larvae. Archives Néerlandaises de Zoologie 16:497–530.

Scriven, R., and C. E. Meloan. 1984. l , 3 , 3-TRIMETHYL-2-OXABICYCLO [2 , 2 , 2] OCTANE (CINEOLE) THAT REPELS THE AMERICAN COCKROACH , PERIPLANETA AMERICANA 1. The Ohio Journal of Science 1984:85–88.

Simão, F. A., R. M. Waterhouse, P. Ioannidis, E. V. Kriventseva, and E. M. Zdobnov. 2015. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31:3210–3212.

Slone, J., J. Daniels, and H. Amrein. 2007. Sugar Receptors in Drosophila. Current Biology 17:1809–1816.

Tanaka, K., Y. Uda, Y. Ono, T. Nakagawa, M. Suwa, R. Yamaoka, and K. Touhara. 2009. Highly Selective Tuning of a Silkworm Olfactory Receptor to a Key Mulberry Leaf Volatile. Current Biology 19:881–890.

Tripathi, A. K., V. Prajapati, K. K. Aggarwal, and S. Kumar. 2001. Toxicity, Feeding Deterrence, and Effect of Activity of 1,8-Cineole from <I>Artemisia annua</I>on Progeny Production of <I>Tribolium castanaeum</I>(Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology 94:979–983.

Vogt, R. G., G. D. Prestwich, and M. R. Lerner. 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. Journal of Neurobiology 22:74–84.

Walker, W. B., F. Gonzalez, S. F. Garczynski, and P. Witzgall. 2016. The chemosensory receptors of codling moth Cydia pomonella-expression in larvae and adults. Scientific Reports 6:1–15.

Walker, W. B., A. Roy, P. Anderson, F. Schlyter, B. S. Hansson, and M. C. Larsson. 2019. Transcriptome Analysis of Gene Families Involved in Chemosensory Function in Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). BMC Genomics 20:428.

Weiss, L. A., A. Dahanukar, J. Y. Kwon, D. Banerjee, and J. R. Carlson. 2011. The Molecular and Cellular Basis of Bitter Taste in Drosophila. Neuron 69:258–272.

Wicher, D., R. Schäfer, R. Bauernfeind, M. C. Stensmyr, R. Heller, S. H. Heinemann, and B. S. Hansson. 2008. Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide- activated cation channels. Nature 452:1007–1011.

Xia, Y., G. Wang, D. Buscariollo, R. J. Pitts, H. Wenger, and L. J. Zwiebel. 2008. The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in Anopheles gambiae larvae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:6433–6438.

Zakir, A., M. Bengtsson, M. M. Sadek, B. S. Hansson, P. Witzgall, and P. Anderson. 2013. Specific response to herbivore-induced de novo synthesized plant volatiles provides reliable information for host plant selection in a moth. Journal of Experimental Biology 216:3257–3263.

Zhang, J., S. Bisch-Knaden, R. A. Fandino, S. Yan, G. F. Obiero, E. Grosse-Wilde, B. S. Hansson, and M. Knaden. 2019. The olfactory coreceptor IR8a governs larval feces-mediated competition avoidance in a hawkmoth. Proceedings of the National Academy of Sciences 116:201913485.

Zhang, Y. N., J. Y. Jin, R. Jin, Y. H. Xia, J. J. Zhou, J. Y. Deng, and S. L. Dong. 2013. Differential Expression Patterns in Chemosensory and Non-Chemosensory Tissues of Putative Chemosensory Genes Identified by Transcriptome Analysis of Insect Pest the Purple Stem Borer Sesamia inferens (Walker). PLoS ONE 8.

Zielonka, M., P. Gehrke, E. Badeke, S. Sachse, H. Breer, and J. Krieger. 2016. Larval sensilla of the moth Heliothis virescens respond to sex pheromone components. Insect Molecular Biology 25:666–678.

Supplementary information

Supplementary data 1. Matrix table with the information from the six libraries sequenced.

Measure	Value		
Filename	SLITAnt1_1_fq_gz	SLITAnt2_1_fq_gz	SLITAnt3_1_fq_gz
File type	Conventional base calls	Conventional base calls	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	65637162	64431634	65842023
Sequences flagged as poor quality	0	0	0
Sequence length	150	150	150
%GC	44	44	44

Measure	Value		
Filename	SLITPalp1_1_fq_gz	SLITPalp2_1_fq_gz	SLITPalp3_1_fq_gz
File type	Conventional base calls	Conventional base calls	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	64376268	75251349	63659718
Sequences flagged as poor quality	0	0	0
Sequence length	150	150	150
%GC	44	44	44

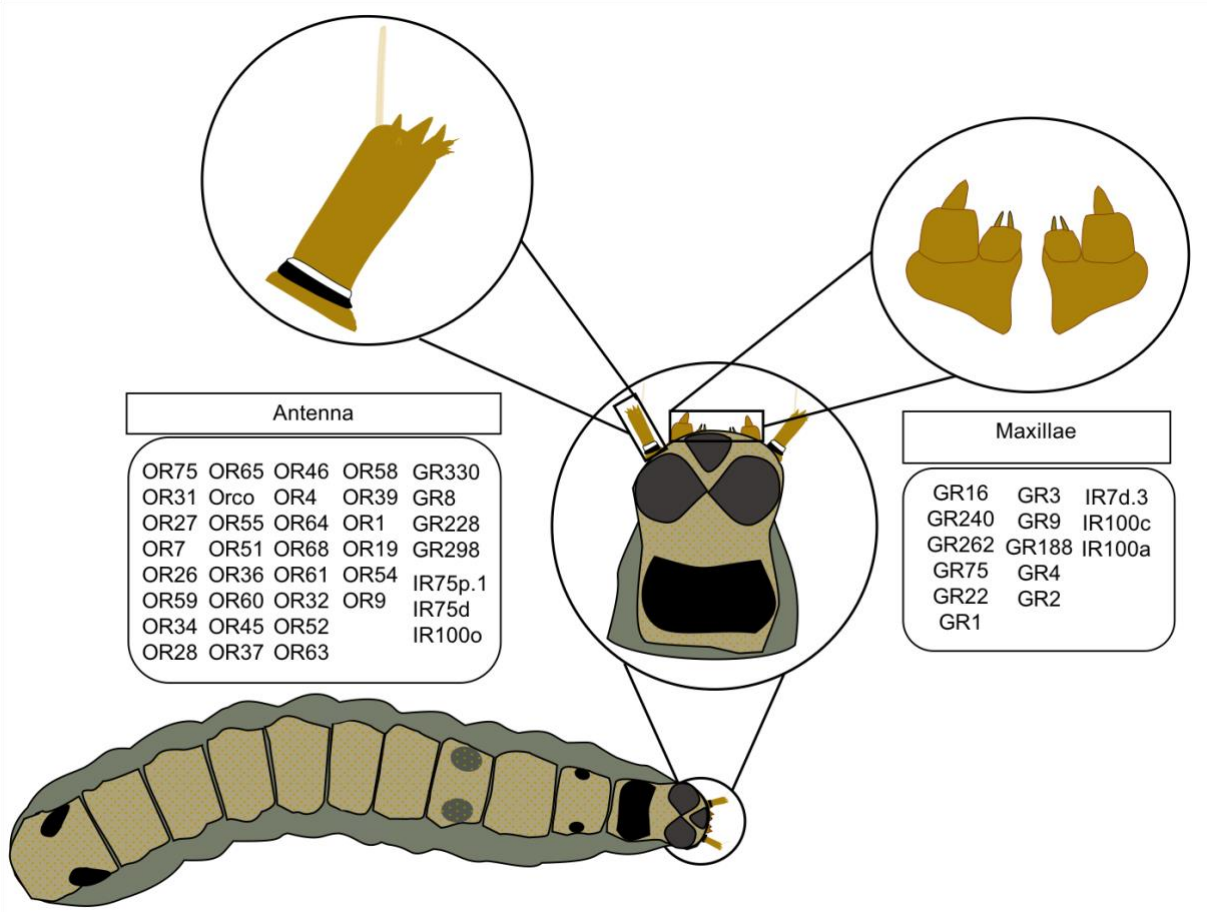
Supplementary data 2. Information concerning the BUSCO analyze:

BUSCO was run in mode: genome

C:98.6% [S:47.3%,D:51.3%],F:0.5%,M:0.9%,n:1658

1634	Complete BUSCOs (C)
784	Complete and single-copy BUSCOs (S)
850	Complete and duplicated BUSCOs (D)
8	Fragmented BUSCOs (F)
16	Missing BUSCOs (M)
1658	Total BUSCO groups searched

Supplementary data 3. Repertoires of chemosensory gene families differentially expressed in the antenna and maxillae respectively in *S. littoralis* larvae.



Supplementary data 4. GO Enrichment.

Total GO for domain Biological process - Antennae

GO Term	S. Freq.	Pop. Freq.	p-value	q-value	Name
GO:0032501	43%	24%	5.25E-20	2.28E-16	multicellular organismal process
GO:0007600	10%	2.4%	5.42E-18	1.18E-14	sensory perception
GO:0009653	24%	12%	1.19E-13	1.04E-10	anatomical structure morphogenesis
GO:0032502	52%	37%	2.03E-12	1.1E-9	developmental process
GO:0007389	12%	4.7%	3.04E-11	1.32E-8	pattern specification process
GO:0007610	14%	6.5%	1.38E-10	4.28E-8	behavior
GO:0042552	3.0%	0.37%	7.97E-10	2.08E-7	myelination
GO:0007411	6.9%	2.2%	2.62E-9	4.74E-7	axon guidance
GO:0060850	2.0%	0.15%	3.48E-9	5.82E-7	regulation of transcription involved in cell fate commitment
GO:0048856	39%	27%	4.97E-9	8,00E-07	anatomical structure development
GO:0099612	1.6%	0.1%	1.94E-8	2.63E-6	protein localization to axon
GO:0042048	2.8%	0.46%	9.59E-8	9.69E-6	olfactory behavior
GO:0048869	26%	17%	2.47E-7	1.99E-5	cellular developmental process
GO:1904937	0.99%	0.03%	2.59E-7	2.05E-5	sensory neuron migration
GO:0009583	2.8%	0.52%	4.5E-7	3.15E-5	detection of light stimulus
GO:0098598	1.2%	0.07%	1.06E-6	6.47E-5	learned vocalization behavior or vocal learning
GO:0015711	6.1%	2.3%	1.2E-6	7.24E-5	organic anion transport
GO:0007016	1.6%	0.16%	1.34E-6	7.75E-5	cytoskeletal anchoring at plasma membrane
GO:0015849	4.7%	1.5%	1.61E-6	8.95E-5	organic acid transport
GO:0008038	3.7%	1.0%	1.69E-6	9.32E-5	neuron recognition
GO:0051239	28%	20%	2.25E-6	1.22E-4	regulation of multicellular organismal process
GO:0031128	1.4%	0.13%	3.32E-6	1.7E-4	developmental induction
GO:0021983	1.6%	0.18%	3.72E-6	1.88E-4	pituitary gland development
GO:1901142	1.2%	0.09%	6.11E-6	2.83E-4	insulin metabolic process
GO:0009786	0.99%	0.06%	7.91E-6	3.51E-4	regulation of asymmetric cell division
GO:0051606	4.1%	1.4%	8.7E-6	3.82E-4	detection of stimulus
GO:1900740	1.2%	0.1%	9.21E-6	0,0004	positive regulation of protein insertion into mitochondrial membrane
GO:0035215	0.59%	0.01%	1.67E-5	6.87E-4	genital disc development
GO:0007224	1.8%	0.29%	1.74E-5	6.99E-4	smoothened signaling pathway
GO:0032879	23%	16%	1.98E-5	7.83E-4	regulation of localization
GO:0050907	1.4%	0.17%	2.01E-5	7.89E-4	detection of chemical stimulus involved in sensory perception
GO:0002052	1.6%	0.23%	2.18E-5	8.39E-4	positive regulation of neuroblast proliferation
GO:0008377	0.79%	0.04%	3.05E-5	1.11E-3	light-induced release of internally sequestered calcium ion
GO:0016037	0.59%	0.02%	4.14E-5	1.42E-3	light absorption
GO:0022008	2.2%	0.49%	4.31E-5	1.47E-3	neurogenesis
GO:0070094	0.79%	0.04%	4.35E-5	1.47E-3	positive regulation of glucagon secretion
GO:0050793	24%	18%	4.88E-5	1.57E-3	regulation of developmental process
GO:0035296	2.4%	0.59%	5.1E-5	1.63E-3	regulation of tube diameter
GO:0048666	4.1%	1.6%	5.93E-5	1.86E-3	neuron development
GO:0010430	0.99%	0.09%	6.61E-5	1.98E-3	fatty acid omega-oxidation
GO:0048070	1.6%	0.27%	7.3E-5	2.17E-3	regulation of developmental pigmentation
GO:0003309	0.79%	0.05%	8.09E-5	2.36E-3	type B pancreatic cell differentiation
GO:1900119	1.2%	0.14%	8.41E-5	2.44E-3	positive regulation of execution phase of apoptosis
GO:0016060	0.79%	0.05%	1.07E-4	2.94E-3	metarhodopsin inactivation

GO:0097306	3.2%	1.1%	1.12E-4	3.05E-3	cellular response to alcohol
GO:0006559	0.99%	0.1%	1.32E-4	3.56E-3	L-phenylalanine catabolic process
GO:0019098	3.6%	1.3%	1.5E-4	3.95E-3	reproductive behavior
GO:1904798	0.79%	0.06%	1.75E-4	4.44E-3	positive regulation of core promoter binding
GO:0009256	0.79%	0.06%	1.75E-4	4.44E-3	10-formyltetrahydrofolate metabolic process
GO:0003322	0.79%	0.06%	1.75E-4	4.44E-3	pancreatic A cell development
GO:0030301	1.8%	0.4%	1.97E-4	4.79E-3	cholesterol transport
GO:0048715	0.99%	0.11%	2.07E-4	5.01E-3	negative regulation of oligodendrocyte differentiation
GO:0032808	0.79%	0.06%	2.18E-4	5.21E-3	lacrimal gland development
GO:0048505	0.79%	0.06%	2.18E-4	5.21E-3	regulation of timing of cell differentiation
GO:1905852	0.59%	0.03%	2.23E-4	5.28E-3	positive regulation of backward locomotion
GO:0061365	0.59%	0.03%	2.23E-4	5.28E-3	positive regulation of triglyceride lipase activity
GO:1901655	2.8%	0.9%	2.25E-4	5.28E-3	cellular response to ketone
GO:0030182	3.7%	1.5%	2.28E-4	5.28E-3	neuron differentiation
GO:0043695	0.39%	0.01%	2.62E-4	5.79E-3	detection of pheromone
GO:0072210	0.39%	0.01%	2.62E-4	5.79E-3	metanephric nephron development
GO:0040017	6.1%	3.1%	2.65E-4	5.79E-3	positive regulation of locomotion
GO:0007435	2.2%	0.6%	2.69E-4	5.79E-3	salivary gland morphogenesis
GO:0022027	0.79%	0.07%	3.28E-4	6.8E-3	interkinetic nuclear migration
GO:0048566	0.79%	0.07%	3.28E-4	6.8E-3	embryonic digestive tract development
GO:0001737	0.79%	0.07%	3.28E-4	6.8E-3	establishment of imaginal disc-derived wing hair orientation
GO:0009609	0.59%	0.03%	3.31E-4	6.8E-3	response to symbiotic bacterium
GO:0001755	1.4%	0.26%	3.5E-4	6.97E-3	neural crest cell migration
GO:0014047	1.2%	0.19%	3.5E-4	6.97E-3	glutamate secretion
GO:0071711	0.99%	0.12%	3.55E-4	7.01E-3	basement membrane organization
GO:0010455	0.99%	0.12%	4.02E-4	7.87E-3	positive regulation of cell fate commitment
GO:0007548	1.4%	0.27%	4.06E-4	7.88E-3	sex differentiation
GO:0021603	0.59%	0.03%	4.67E-4	8.87E-3	cranial nerve formation
GO:0072337	1.4%	0.27%	4.69E-4	8.87E-3	modified amino acid transport
GO:0021902	0.79%	0.07%	4.74E-4	8.88E-3	commitment of neuronal cell to specific neuron type in forebrain
GO:0016486	0.79%	0.07%	4.74E-4	8.88E-3	peptide hormone processing

Total GO for domain Molecular function - Antennae

GO Term	S. Freq.	Pop. Freq.	p-value	q-value	Name
GO:0000977	10	4,1	4.05E-9	1.64E-6	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0000976	10	4,5	2.89E-8	5.85E-6	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0003700	13	5,9	2.98E-8	5.85E-6	DNA-binding transcription factor activity
GO:0005186	0,84	0,01	5.54E-8	7.46E-6	pheromone activity
GO:1990837	11	5	1.84E-7	2.13E-5	sequence-specific double-stranded DNA binding
GO:0015171	2,9	0,57	7.56E-7	5.09E-5	amino acid transmembrane transporter activity
GO:0022857	13	6,7	1.11E-6	6.87E-5	transmembrane transporter activity
GO:0004838	0,84	0,02	1.87E-6	1.08E-4	L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase activity
GO:0005215	13	7,3	4.9E-6	1.98E-4	transporter activity
GO:0140110	14	8,5	1.3E-5	4.14E-4	transcription regulator activity
GO:0042605	1,3	0,12	1.69E-5	5.07E-4	peptide antigen binding
GO:0005549	1	0,08	2.82E-5	7.86E-4	odorant binding

GO:0060089	6,9	3,2	4.5E-5	1.1E-3	molecular transducer activity
GO:0038023	6,3	2,8	5.14E-5	1.19E-3	signaling receptor activity
GO:0008236	3,1	1	1.17E-4	2.43E-3	serine-type peptidase activity
GO:0004497	3,1	1	1.77E-4	3.48E-3	monooxygenase activity
GO:0002046	0,63	0,03	1.91E-4	3.51E-3	opsin binding
GO:0071837	1	0,12	2.45E-4	4.15E-3	HMG box domain binding
GO:0005200	2,5	0,74	2.46E-4	4.15E-3	structural constituent of cytoskeleton
GO:0015085	2,3	0,64	2.93E-4	4.65E-3	calcium ion transmembrane transporter activity
GO:0004046	0,84	0,07	3.89E-4	5.82E-3	aminoacylase activity
GO:0046790	0,84	0,07	3.89E-4	5.82E-3	virion binding
GO:0010461	0,63	0,04	5.45E-4	7.86E-3	light-activated ion channel activity
GO:0035591	1,9	0,49	5.77E-4	8.18E-3	signaling adaptor activity

Total GO for domain Molecular function – Palps

GO Term	S. Freq.	Pop. Freq.	p-value	q-value	Name
GO:0008092	15%	6.1%	5.81E-19	6.29E-16	cytoskeletal protein binding
GO:0022857	14%	6.7%	5.89E-15	1.59E-12	transmembrane transporter activity
GO:0005215	15%	7.3%	9.22E-14	2,00E-11	transporter activity
GO:0008307	2.3%	0.28%	4.68E-12	7.23E-10	structural constituent of muscle
GO:0000146	1.9%	0.25%	9.95E-10	8.97E-8	microfilament motor activity
GO:0030899	1.0%	0.05%	3.26E-9	2.52E-7	calcium-dependent ATPase activity
GO:0004054	0.51%	0.01%	4.1E-7	2.01E-5	arginine kinase activity
GO:0019010	0.63%	0.03%	5.43E-7	2.55E-5	farnesoic acid O-methyltransferase activity
GO:0035049	0.63%	0.03%	5.43E-7	2.55E-5	juvenile hormone acid methyltransferase activity
GO:0030898	1.4%	0.22%	1.06E-6	4.25E-5	actin-dependent ATPase activity
GO:0005509	4.9%	2.1%	1.44E-6	5.36E-5	calcium ion binding
GO:0035240	0.51%	0.02%	5.9E-6	2.02E-4	dopamine binding
GO:0000981	7.4%	4.0%	1.01E-5	3.11E-4	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific
GO:0051010	1.0%	0.15%	2.16E-5	5.98E-4	microtubule plus-end binding
GO:0015370	1.4%	0.3%	2.64E-5	6.97E-4	solute:sodium symporter activity
GO:0015108	1.8%	0.53%	9.12E-5	1.86E-3	chloride transmembrane transporter activity
GO:0015378	0.89%	0.14%	9.52E-5	1.91E-3	sodium:chloride symporter activity
GO:0016620	2.0%	0.68%	1.05E-4	2.03E-3	oxidoreductase activity
GO:0004348	0.63%	0.06%	1.17E-4	2.14E-3	glucosylceramidase activity
GO:0050113	0.51%	0.04%	1.72E-4	3.01E-3	inositol oxygenase activity
GO:0004591	0.51%	0.04%	1.72E-4	3.01E-3	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity
GO:0008028	1.1%	0.25%	1.74E-4	3.01E-3	monocarboxylic acid transmembrane transporter activity
GO:0008199	0.76%	0.11%	1.91E-4	3.13E-3	ferric iron binding
GO:0016491	12%	8.3%	2.41E-4	3.83E-3	oxidoreductase activity
GO:0004111	0.51%	0.04%	2.44E-4	3.83E-3	creatine kinase activity
GO:0004336	0.51%	0.04%	2.44E-4	3.83E-3	galactosylceramidase activity
GO:0017042	0.51%	0.04%	2.44E-4	3.83E-3	glycosylceramidase activity
GO:0000977	6.7%	4.1%	2.84E-4	4.16E-3	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0060308	0.38%	0.02%	3.06E-4	4.36E-3	GTP cyclohydrolase I regulator activity
GO:0031883	0.38%	0.02%	3.06E-4	4.36E-3	taste receptor binding
GO:0003934	0.38%	0.02%	5.26E-4	6.7E-3	GTP cyclohydrolase I activity

GO:0043924	0.25%	0.01%	6.42E-4	7.98E-3	suramin binding
GO:0034617	0.25%	0.01%	6.42E-4	7.98E-3	tetrahydrobiopterin binding
GO:0030371	0.89%	0.19%	7.1E-4	8.45E-3	translation repressor activity
GO:0004745	0.76%	0.14%	7.13E-4	8.45E-3	retinol dehydrogenase activity
GO:0004719	0.38%	0.03%	8.26E-4	9.51E-3	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase activity
GO:0048763	0.38%	0.03%	8.26E-4	9.51E-3	calcium-induced calcium release activity

Total GO for domain Biological Process – Palps

GO Term	S. Freq.	Pop. Freq.	p-value	q-value	name
GO:0003012	7.1%	1.1%	9.43E-30	5.12E-26	muscle system process
GO:0030036	9.4%	2.7%	4.15E-21	5.64E-18	actin cytoskeleton organization
GO:0006937	5.1%	1.0%	1.95E-17	1.32E-14	regulation of muscle contraction
GO:0043050	1.3%	0.07%	1.01E-12	4.21E-10	pharyngeal pumping
GO:0007610	13%	6.5%	3.58E-11	1.21E-8	behavior
GO:0032501	34%	24%	8.2E-11	2.12E-8	multicellular organismal process
GO:0048646	12%	6.2%	9.39E-11	2.32E-8	anatomical structure formation involved in morphogenesis
GO:0006811	13%	7.0%	9.46E-11	2.32E-8	ion transport
GO:0060361	1.3%	0.1%	1.26E-10	2.85E-8	flight
GO:0044057	8.1%	3.4%	1.76E-10	3.81E-8	regulation of system process
GO:0055014	0.73%	0.02%	3.13E-10	6.29E-8	atrial cardiac muscle cell development
GO:0046716	2.4%	0.44%	6.69E-10	1.3E-7	muscle cell cellular homeostasis
GO:0043520	1.1%	0.07%	1.21E-9	2.26E-7	regulation of myosin II filament assembly
GO:0097435	6.4%	2.6%	5.47E-9	9.43E-7	supramolecular fiber organization
GO:0036309	0.98%	0.06%	7.29E-9	1.2E-6	protein localization to M-band
GO:0001705	0.73%	0.03%	8.37E-9	1.34E-6	ectoderm formation
GO:0060047	1.5%	0.17%	9.33E-9	1.41E-6	heart contraction
GO:0006718	0.98%	0.07%	3.16E-8	4.09E-6	juvenile hormone biosynthetic process
GO:0015850	2.8%	0.78%	1.36E-7	1.61E-5	organic hydroxy compound transport
GO:0015893	3.1%	0.91%	1.38E-7	1.61E-5	drug transport
GO:0048644	0.98%	0.08%	1.53E-7	1.68E-5	muscle organ morphogenesis
GO:0022904	2.6%	0.67%	1.75E-7	1.87E-5	respiratory electron transport chain
GO:0021527	0.86%	0.06%	2.01E-7	2.06E-5	spinal cord association neuron differentiation
GO:0007626	5.1%	2.2%	4.4E-7	4.05E-5	locomotory behavior
GO:0030728	0.98%	0.09%	5.54E-7	4.93E-5	ovulation
GO:0030182	3.9%	1.5%	7.08E-7	6.2E-5	neuron differentiation
GO:0006734	1.8%	0.41%	1.36E-6	1.1E-4	NADH metabolic process
GO:1904427	1.6%	0.31%	1.49E-6	1.16E-4	positive regulation of calcium ion transmembrane transport
GO:0015766	1.6%	0.32%	1.88E-6	1.42E-4	disaccharide transport
GO:0034754	2.6%	0.78%	1.94E-6	1.44E-4	cellular hormone metabolic process
GO:0035847	0.49%	0.02%	2.27E-6	1.64E-4	uterine epithelium development
GO:0035849	0.49%	0.02%	2.27E-6	1.64E-4	nephric duct elongation
GO:0035852	0.49%	0.02%	2.27E-6	1.64E-4	horizontal cell localization
GO:0048785	0.49%	0.02%	2.27E-6	1.64E-4	hatching gland development
GO:0060067	0.49%	0.02%	2.27E-6	1.64E-4	cervix development
GO:0023052	4.9%	2.2%	2.3E-6	1.64E-4	signaling

GO:0051937	1.3%	0.23%	2.57E-6	1.68E-4	catecholamine transport
GO:0055015	0.86%	0.08%	3.46E-6	2.18E-4	ventricular cardiac muscle cell development
GO:0019098	3.4%	1.3%	4.53E-6	2.73E-4	reproductive behavior
GO:0019368	1.1%	0.16%	5.21E-6	3.04E-4	fatty acid elongation, unsaturated fatty acid
GO:0006099	2.0%	0.52%	5.89E-6	3.4E-4	tricarboxylic acid cycle
GO:2000768	0.49%	0.02%	6.66E-6	3.77E-4	positive regulation of nephron tubule epithelial cell differentiation
GO:0035565	0.49%	0.02%	6.66E-6	3.77E-4	regulation of pronephros size
GO:0072278	0.49%	0.02%	6.66E-6	3.77E-4	metanephric comma-shaped body morphogenesis
GO:0072284	0.49%	0.02%	6.66E-6	3.77E-4	metanephric S-shaped body morphogenesis
GO:0040011	11%	6.5%	7.07E-6	3.8E-4	locomotion
GO:0048856	34%	27%	7.72E-6	4.09E-4	anatomical structure development
GO:0032310	0.61%	0.04%	8.18E-6	4.27E-4	prostaglandin secretion
GO:0042574	0.98%	0.13%	9.35E-6	4.74E-4	retinal metabolic process
GO:0051924	3.1%	1.2%	1.51E-5	7.01E-4	regulation of calcium ion transport
GO:0035502	0.49%	0.02%	1.52E-5	7.01E-4	metanephric part of ureteric bud development
GO:0072283	0.49%	0.02%	1.52E-5	7.01E-4	metanephric renal vesicle morphogenesis
GO:0014034	0.49%	0.02%	1.52E-5	7.01E-4	neural crest cell fate commitment
GO:0060068	0.49%	0.02%	1.52E-5	7.01E-4	vagina development
GO:0050673	1.7%	0.45%	2.09E-5	8.88E-4	epithelial cell proliferation
GO:0030534	3.9%	1.7%	2.15E-5	9.05E-4	adult behavior
GO:0015718	2.1%	0.65%	2.54E-5	1.04E-3	monocarboxylic acid transport
GO:0046314	0.49%	0.03%	2.98E-5	1.2E-3	phosphocreatine biosynthetic process
GO:0072177	0.49%	0.03%	2.98E-5	1.2E-3	mesonephric duct development
GO:1901136	2.6%	0.93%	3.08E-5	1.2E-3	carbohydrate derivative catabolic process
GO:0016052	3.2%	1.3%	3.23E-5	1.23E-3	carbohydrate catabolic process
GO:0007622	1.8%	0.53%	3.53E-5	1.33E-3	rhythmic behavior
GO:0032596	0.73%	0.08%	4.6E-5	1.68E-3	protein transport into membrane raft
GO:0032525	0.73%	0.08%	4.6E-5	1.68E-3	somite rostral/caudal axis specification
GO:0009952	2.4%	0.9%	6.01E-5	2,00E-03	anterior/posterior pattern specification
GO:0019722	2.1%	0.69%	6.27E-5	2.04E-3	calcium-mediated signaling
GO:0006629	11%	7.5%	6.65E-5	2.15E-3	lipid metabolic process
GO:0007267	3.9%	1.9%	6.83E-5	2.2E-3	cell-cell signaling
GO:0032981	1.5%	0.38%	6.89E-5	2.2E-3	mitochondrial respiratory chain complex I assembly
GO:0014813	0.37%	0.01%	6.97E-5	2.21E-3	skeletal muscle satellite cell commitment
GO:1902811	0.37%	0.01%	6.97E-5	2.21E-3	positive regulation of skeletal muscle fiber differentiation
GO:0072375	0.86%	0.13%	7.13E-5	2.21E-3	medium-term memory
GO:0072521	5.6%	3.1%	7.14E-5	2.21E-3	purine-containing compound metabolic process
GO:0030049	0.73%	0.09%	7.2E-5	2.21E-3	muscle filament sliding
GO:0070509	1.2%	0.27%	7.5E-5	2.25E-3	calcium ion import
GO:0071872	0.61%	0.06%	7.77E-5	2.32E-3	cellular response to epinephrine stimulus
GO:0048878	9.1%	5.7%	7.87E-5	2.34E-3	chemical homeostasis
GO:0061205	0.49%	0.03%	8.57E-5	2.53E-3	paramesonephric duct development
GO:2000744	0.49%	0.03%	8.57E-5	2.53E-3	positive regulation of anterior head development
GO:0032502	43%	37%	8.6E-5	2.53E-3	developmental process
GO:0061326	1.1%	0.23%	9.51E-5	2.69E-3	renal tubule development
GO:0065008	30%	25%	9.87E-5	2.76E-3	regulation of biological quality
GO:0007427	1.1%	0.23%	1.06E-4	2.91E-3	epithelial cell migration, open tracheal system
GO:0048729	6.1%	3.5%	1.14E-4	3.09E-3	tissue morphogenesis
GO:0046514	0.86%	0.14%	1.15E-4	3.09E-3	ceramide catabolic process

GO:0021871	0.49%	0.04%	1.32E-4	3.53E-3	forebrain regionalization
GO:0039003	0.49%	0.04%	1.32E-4	3.53E-3	pronephric field specification
GO:0006680	0.61%	0.06%	1.35E-4	3.53E-3	glucosylceramide catabolic process
GO:0106077	0.61%	0.06%	1.35E-4	3.53E-3	histone succinylation
GO:0008363	0.73%	0.1%	1.58E-4	3.93E-3	larval chitin-based cuticle development
GO:0051615	0.37%	0.02%	1.71E-4	4.16E-3	histamine uptake
GO:1903515	0.37%	0.02%	1.71E-4	4.16E-3	calcium ion transport from cytosol to endoplasmic reticulum
GO:0006874	3.2%	1.4%	1.77E-4	4.22E-3	cellular calcium ion homeostasis
GO:0010830	0.98%	0.2%	1.82E-4	4.31E-3	regulation of myotube differentiation
GO:0034762	4.9%	2.7%	1.86E-4	4.38E-3	regulation of transmembrane transport
GO:0070885	0.73%	0.11%	1.89E-4	4.43E-3	negative regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade
GO:0060441	0.49%	0.04%	1.94E-4	4.48E-3	epithelial tube branching involved in lung morphogenesis
GO:0021533	0.86%	0.15%	2.05E-4	4.7E-3	cell differentiation in hindbrain
GO:0007380	0.61%	0.07%	2.19E-4	4.97E-3	specification of segmental identity, head
GO:0014019	0.73%	0.11%	2.25E-4	5.03E-3	neuroblast development
GO:0007413	0.86%	0.15%	2.35E-4	5.23E-3	axonal fasciculation
GO:0009886	4.0%	2.1%	2.49E-4	5.47E-3	post-embryonic animal morphogenesis
GO:0010649	0.73%	0.11%	2.65E-4	5.79E-3	regulation of cell communication by electrical coupling
GO:0006554	0.73%	0.11%	2.65E-4	5.79E-3	lysine catabolic process
GO:0006104	0.73%	0.11%	2.65E-4	5.79E-3	succinyl-CoA metabolic process
GO:0001706	0.61%	0.07%	2.74E-4	5.88E-3	endoderm formation
GO:1903017	0.49%	0.04%	2.74E-4	5.88E-3	positive regulation of exo-alpha-sialidase activity
GO:0051692	0.49%	0.04%	2.74E-4	5.88E-3	cellular oligosaccharide catabolic process
GO:1900074	0.49%	0.04%	2.74E-4	5.88E-3	negative regulation of neuromuscular synaptic transmission
GO:0009150	4.8%	2.6%	2.9E-4	6.09E-3	purine ribonucleotide metabolic process
GO:0016477	7.3%	4.6%	3.04E-4	6.27E-3	cell migration
GO:2000543	0.73%	0.12%	3.12E-4	6.41E-3	positive regulation of gastrulation
GO:0098900	1.2%	0.32%	3.17E-4	6.47E-3	regulation of action potential
GO:0060083	0.37%	0.02%	3.35E-4	6.77E-3	smooth muscle contraction involved in micturition
GO:0043095	0.37%	0.02%	3.35E-4	6.77E-3	regulation of GTP cyclohydrolase I activity
GO:0042416	0.61%	0.08%	3.38E-4	6.77E-3	dopamine biosynthetic process
GO:2000274	0.61%	0.08%	4.14E-4	7.97E-3	regulation of epithelial cell migration, open tracheal system
GO:0006105	0.61%	0.08%	4.14E-4	7.97E-3	succinate metabolic process
GO:0016137	0.98%	0.22%	4.3E-4	8.11E-3	glycoside metabolic process
GO:0086012	0.86%	0.17%	4.39E-4	8.25E-3	membrane depolarization during cardiac muscle cell action potential
GO:0032970	4.4%	2.4%	4.58E-4	8.57E-3	regulation of actin filament-based process
GO:0035637	1.1%	0.28%	4.92E-4	9.13E-3	multicellular organismal signaling
GO:1990573	0.86%	0.17%	4.93E-4	9.13E-3	potassium ion import across plasma membrane
GO:0060087	0.49%	0.05%	5.02E-4	9.21E-3	relaxation of vascular smooth muscle
GO:0007526	1.1%	0.28%	5.35E-4	9.72E-3	larval somatic muscle development

Chapitre 2 : Identification de nouveaux ligands écologiquement pertinents pour les récepteurs olfactifs d'un papillon de nuit en utilisant la séparation par chromatographie en phase gazeuse d'extraits d'odeurs de plantes couplée à l'électrophysiologie

Introduction

Les insectes utilisent des signaux chimiques pour accomplir des activités vitales telles que la recherche de nourriture, trouver un partenaire sexuelle, ou trouver l'endroit propice pour la ponte (De Bruyne and Baker 2008). Comprendre comment les signaux des plantes hôtes et non hôtes sont codés à la périphérie du système olfactif des insectes pourrait contribuer à déchiffrer les mécanismes neuronaux dans le processus de reconnaissances des odeurs. Des méthodes électrophysiologiques sont appropriées pour trouver les molécules actives chez l'insecte et tout particulièrement l'utilisation de méthodes combinées qui permettent l'identification des composés individuels dans un mélange complexe en même temps que l'enregistrement des réponses neuronales de l'insecte face aux stimuli.

Chez *S. littoralis*, la déorphanisation d'un premier set de 15 OR a été réalisée par de Fouchier et al. (2017), apportant des informations clés pour comprendre le codage olfactif chez cette espèce, et démontrant de plus que le système d'expression hétérologue en neurone vide chez la drosophile est une méthode applicable aussi pour des insectes en dehors des diptères. Néanmoins, les composés testés dans cette étude ont été choisis en fonction des données trouvées dans la littérature, donc il est possible que de nombreux ligands restent encore à découvrir. Dans le travail présenté dans ce chapitre, nous avons cherché à identifier des volatils de plante écologiquement pertinents qui activeraient des OR de *S. littoralis* (SlitOR). Nous avons donc utilisé une approche sans *a priori* d'identification des ligands incluant la chromatographie en phase gazeuse (GC) d'extraits de plantes, couplée à l'électrophysiologie (expression hétérologue des SlitOR dans des neurones de drosophile et enregistrement monosensillaire, SSR). Les SlitOR testés dans cette étude sont exprimés chez les adultes, mais certains le sont également chez les chenilles.

L'approche couplée GC-SSR est tout à fait pertinente pour l'identification de ligands, cependant il est parfois difficile de savoir quel composé a engendré une réponse en SSR, car les mélanges sont complexes et les molécules ne se séparent parfois pas bien lors de la chromatographie. Pour vérifier l'activité des nouveaux ligands identifiés, il est donc indispensable de conduire des expériences complémentaires de SSR sur les mêmes neurones exprimant les SlitOR, mais en utilisant des molécules de synthèse. Ma contribution dans ce travail, fruit d'une collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire d'écologie chimique du SLU (Alnarp, Suède) a été de réaliser ces enregistrements SSR de vérification.

Grâce à cette approche, nous avons ainsi identifié neuf nouveaux ligands pour six SlitOR. Les composés actifs identifiés proviennent de plantes hôtes et non-hôtes, et jouent probablement des rôles différents dans le comportement des adultes, mais aussi des larves. En effet, trois des six SlitOR (SlitOR 4, 32 et 36) sont aussi exprimés chez les larves, selon l'étude transcriptomique détaillée dans le chapitre 1 (Caballero-Vidal et al., en préparation). Il serait pertinent à terme de réaliser des études comportementales pour vérifier le rôle des nouveaux ligands identifiés dans l'attraction ou la répulsion des chenilles de *S. littoralis*.

En résumé, cette technique nous a donc permis d'élargir le répertoire des ligands pour différents SlitOR, permettant l'identification de ligands naturels. Les résultats obtenus aident également à élucider comment les OSN de *S. littoralis* peuvent coder la qualité des odeurs des plantes hôtes et non hôtes.

Identification of new ecologically relevant ligands for odorant receptors in a moth using gas chromatography separation of plant headspace extracts coupled to electrophysiology

Claudia Steiner[1,†], Gabriela Caballero-Vidal[2], William B. Walker III[1], Arthur de Fouchier[2,†], Göran Birgersson[1], Muhammad Binyameen[1,†], Christelle Monsempes[2], Peter Andersson[1], Fredrik Schlyter[1], Nicolas Montagné[2], Emmanuelle Jacquin-Joly[2*] & Mattias C. Larsson[1*]

[1] Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sundsvägen 5, 230 53 Alnarp, Sweden
[2] INRAE, Sorbonne Université, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Diderot, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France

[†] Present addresses:
UMR Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie, CNRS, IRD, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France (C.S) ; Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée (LEEC), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France (A.d.F.) ; Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 1176, Prague 6, Suchdol 165 21, Czech Republic (M.B.)

* Corresponding authors:
Mattias C. Larsson
Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sundsvägen 5, 230 53 Alnarp, Sweden.
mattias.larsson@slu.se
+46 46 40 41 53 10

Emmanuelle Jacquin-Joly
INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.
emmanuelle.joly@inrae.fr
+33 1 30 83 32 12

Abstract

Herbivorous species detect and select host plants via volatile organic compounds (VOCs) emitted by the plants. At the core of this detection process are the odorant receptors (ORs). Identifying ligands for these receptors is a way to identify ecologically-relevant cues to better understand olfactory-based host plant selection in herbivorous insects. Yet, most functional studies conducted on ORs were conducted using only a limited number of VOCs, possibly limiting the identification of crucial cues. To address this issue, we report here an original approach combining gas-chromatography (GC) and single-sensillum recording of ORs from the herbivorous pest noctuid *Spodoptera littoralis* heterologously expressed in the *Drosophila* empty neuron system. With this approach, it is possible to challenge a given OR with all the components of a plant headspace delivered via GC, without any pre-selection. This allowed us to identify nine novel VOC ligands for six *S. littoralis* ORs, extending our knowledge on volatile cues that this species may use to recognize host and non host plants.

Introduction

In insects, the detection of a vast number of volatiles triggers different behavioral responses that allow them to accomplish vital activities, such as reproduction, predator avoidance, feeding and oviposition (Renwick 1989, De Bruyne and Baker 2008). This is particularly true in herbivorous insects, which recognize their host plants through the perception of volatile organic compounds (VOCs) (Bruce et al. 2005). To decipher the neural mechanisms underlying this recognition process, it is first necessary to understand how host and non-host plant signals are encoded at the periphery of the insect olfactory system. In insects, detection of volatile cues is mediated by odorant receptor (OR) proteins expressed in olfactory sensory neurons (OSNs) housed in sensilla mainly located on the antennae (Leal 2013). In general, each class of OSNs expresses one type of OR and the ubiquitous OR coreceptor Orco (Larsson et al. 2004, Benton et al. 2006). The number of ORs expressed in the olfactory organs of a given species and the response spectra of these ORs thus determine the number of OSN classes and the olfactory detection capacities of an insect.

This insect peripheral olfactory system is well suited for electrophysiological analyses. It is thus relatively easy to identify which of the VOCs found in a plant headspace are detected by the antennae of an herbivorous insect, notably by using gas chromatography coupled to electroantennography detection (GC-EAD). With this integrated method, the VOCs are separated from the blend and are at the same time sent individually to the antenna where the summed response of OSNs is recorded (Jönsson and Anderson 1999, Bengtsson et al. 2009, Zakir et al. 2013, Conchou et al. 2017). However, it is far more challenging to identify precisely which class of OSNs respond to which VOC using single-sensillum recordings (SSR), even though a few comprehensive analyses have already been performed on moths (Binyameen et al. 2014). An alternative is to study the response spectra of heterologously expressed ORs, which can be used as a proxy for the response of the different classes of OSNs and thus enlighten peripheral coding of plant odours in herbivores.

In vitro systems such as *Xenopus* oocytes (Tanaka et al. 2009, Wang et al. 2010), lepidopteran Sf9 cells (Kiely et al. 2007, Smart et al. 2008) or Human embryonic kidney (HEK293) cells (Große-Wilde et al. 2006, Forstner et al. 2009, Corcoran et al. 2014, Yuvaraj et al. 2018) have been widely

used for the expression of insect ORs. However, the use of *in vivo* systems such as the *Drosophila* empty neuron (Dobritsa et al. 2003) is particularly advantageous, as the function of ORs may be influenced by their cellular environment (Jones et al. 2005, Stengl and Funk 2013, de Fouchier et al. 2014). Up until now, large-scale functional analyses of OR repertoires in the empty neuron system have been carried out in the fruit fly (Hallem and Carlson 2006, Kreher et al. 2008) and the malaria mosquito (Carey et al. 2010) but also in a herbivorous insect, the polyphagous moth *Spodoptera littoralis*, where 15 ORs tuned to plant VOCs have been identified (de Fouchier et al. 2017).

S. littoralis is a serious pest on a variety of crops in Africa, the Middle East and the Mediterranean basin (Salama et al. 1971). In laboratory experiments, both adult males and females are attracted towards a blend of VOCs emitted by cotton, a host plant, whereas herbivore-induced volatiles released by damaged cotton reduce attraction towards the host and oviposition (Zakir et al. 2013, Borrero-Echeverry et al. 2015, Hatano et al. 2015). Moreover, unmated females are attracted by VOCs from lilac flowers, which are a source of nectar, whereas mated females switch their preference to cotton VOCs (Saveer et al. 2012). Volatiles from non-host plants, such as spruce, also influence reproductive behaviors in female and male adults (Binyameen et al. 2013). As for larvae, they are attracted towards ubiquitous green leaf volatiles and aromatic compounds (Rharrabe et al. 2014, de Fouchier et al. 2018). A previous study focusing on a selection of ~40 of these relevant cues identified 15 responding ORs from this species (de Fouchier et al. 2017). The aim of the present work is to extend without any *a priori* the stimulation panel to identify additional ecologically-relevant VOCs that would activate *S. littoralis* ORs (SlitORs). To do so, we used gas chromatography coupled to SSR to separate nine headspaces from a range of host and non-host plants and stimulate at the same time *Drosophila* OSNs expressing the SlitORs. Seventeen out of the 29 SlitORs tested were activated by VOCs from at least one of the plant headspaces. We notably identified novel ligands for six SlitORs, emitted by host as well as non-host plants. Three out of these six SlitORs are expressed in adults and larvae, suggesting they might detect volatiles with ecological importance at all life stages.

Materials and methods

Plant headspace volatile collection

Cotton (*Gossypium hirsutum* L., var. Delta Pineland 90), cowpea (*Vigna unguiculata* L.), cabbage (*Brassica oleracea* L.), maize (*Zea mays* L.), clover (*Trifolium pratense* L.), spruce (*Picea abies* L.) and malabar nut (*Adhatoda vasica* L.) plants were grown individually in pots (1.5 L) filled with soil in a growth chamber at 25 ± 2 °C and 65 ± 5% relative humidity. For damaged cotton, six-week-old cotton plants (6-8 true leaves) were subjected to 12–16 *S. littoralis* fourth-instar larval feeding for 48 hours prior to odor collection. Larvae were kept feeding on the plants during odor collection.

Headspace collections were made by placing individual plants in polyacetate oven bags (Toppits 3 m, Melitta Scandinavia AB, Klippan, Sweden). The collection bags were equipped with two valves,

one at the bottom of the bag through which a charcoal-filtered air entered the system; the second valve, situated at the top of the bag, withdrew the scented air by passing through the adsorbent filter (Teflon tube, 30 × 3 mm) containing 50-60 mg of adsorbent (Porapak Super Q). Polypropylene wool and 0.3 cm Teflon stop plugs were inserted on both sides of the filter after filling them with the adsorbent. The filters were rinsed with 2 ml of acetone followed by ethanol and re-distilled *n*-hexane before using them for odor collection. The pot with soil was excluded by making the bag airtight around the stem of the plant above the soil. An air stream of 300 ml.min^{-1} of charcoal filtered air was pumped inside the bag and 150 ml.min^{-1} was taken out through the adsorbent filters by using 12V diaphragm vacuum pumps (KNF Neuberger, Stockholm, Sweden). Volatile collections were performed for 8 hours (except for cotton, 12 hours) in low light (3–4 lux) at a temperature of 22 ± 1°C. Extracts were eluted by rinsing adsorbent filters with 500 µl of distilled *n*-hexane and then pooled and condensed to get an amount of 1 µl = 10 min aeration to use for chemical analyses and electrophysiological recordings. Samples were stored in glass vials at –18 °C when not in use.

Lilac flowers (*Syringa vulgaris* L.) were field collected (Alnarpsgården, Alnarp, Sweden) during June-July 2009. Headspace volatiles from freshly cut flowers of lilac blossom were collected in the same way as described above, except that headspace apparatus was made of glass as detailed in Saveer et al. (2012). The filters were made of glass tubes (50 x 6 mm) and contained 150–200 mg of Porapak Super Q adsorbent between glass wool plugs. After removing leaves, the flower branches were enclosed in a 5 L glass jar, which was closed from the base with a glass fitting. The cut end of the branch was placed in a 20 ml glass vial filled with tap water. A charcoal-filtered continuous air stream was pulled over the flower material at a flow rate of 150 ml.min^{-1} from the bottom to the top of the jar, where the scented air was directed over the adsorbent (Bengtsson et al. 2001, Saveer et al. 2012). Trapped volatiles were eluted using 500 µl of distilled *n*-hexane.

Transgenic Drosophila lines expressing SlitORs

The *D. melanogaster* lines expressing each SlitOR in ab3A OSNs were those described in de Fouchier et al. (2017). Flies were reared on standard cornmeal-yeast-agar medium at 25 °C, under a 12 h light: 12 h dark cycle.

Gas Chromatography coupled to Single Sensillum Recordings (GC-SSR)

A GC (Agilent J&W) equipped with a HP-5 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm) was used to separate individual constituents of 2 µL of headspace extracts (Wadhams 1982). Standards (reference compounds) were injected in the GC prior to start the experiments. GC oven temperature was programmed from 50 °C (2 min hold) at 8 °C min^{-1} to 250 °C (5 min hold). Hydrogen was used as the mobile phase at an average linear flow of 45 cm s $^{-1}$. For other details, see Saveer et al. (2012). In the GC, a glass splitter installed at the end of the GC-column led half of the effluent into the continuous air stream (1 L. min^{-1}) over the *Drosophila* antenna through a glass tube and the other half to the flame ionization detector (FID) of the GC. Thus, the activity of an OSN and the gas chromatogram of the compounds in the GC-column were recorded simultaneously.

GC-SSR experiments were done on 29 SlitOR-expressing fly lines. Each headspace was tested between 1 and 6 times on each fly line. SSR were conducted as described previously by de Fouchier et al. (2017). Briefly, two- to 8-day-old flies were placed in a pipette tip, only the head sticking out. The antenna was immobilized using a glass capillary so the ab3 sensilla containing the SlitOR-expressing OSNs were well exposed for recording. The reference electrode was inserted into the eye and the recording electrode was inserted at the base of an ab3 sensillum. Each run took between 30 and 40 minutes and FID peaks in each extract, retention times and ab3A OSN action potentials were visualized using Syntech Auto Spike 32 software.

Identification of plant volatiles

The electrophysiologically active compounds were identified from the headspace volatile extracts by a GC coupled to mass spectrometry (GC-MS) (6890 GC and 5975 MS; Agilent Technologies, CA, USA). The capillary column and the temperature program were the same as that used in the GC-SSR experiments (above), except that compounds were also separated on a polar capillary column DB-WAX (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm). Two μl of each sample were injected into the GC-MS by means of an auto sampler (7683B Series, Agilent). Helium was used as carrier gas at an average linear flow rate of 35 $cm.s^{-1}$. The identity of active compounds was determined according to their GC retention times (Kovat's indices) and by comparing their mass spectra to references from mass spectral libraries (NIST and Wiley). Authentic synthetic standards were then injected in GC-MS to confirm compounds identification.

Confirmation of novel ligands by SSR with synthetic compounds

Whenever a potential novel ligand was identified for a SlitOR, SSRs were conducted using synthetic compounds. Stimulus cartridges were built by placing a 1 cm^2 filter paper in a Pasteur pipette and loading 10 μl of the odorant dilution onto the paper (10^{-2} dilution in paraffin oil), or 10 μl of paraffin oil as control. Odorant stimulations were performed by inserting the tip of the pipette into a hole in a glass tube and generating a 500 ms air pulse (0.6 $l.min^{-1}$). The stimulus cartridges were used at most twice per fly (and maximum eight times in total). Previously known SlitOR ligands were used as control. Odorants were considered as active if the response was statistically different from the response elicited by the solvent alone (Kruskal–Wallis test, followed by a Dunnett multiple comparison test, $p<0.05$).

Results

Identification of plant VOCs that activate SlitORs using GC-SSR

Among the different SlitORs tested with GC-separated plant headspace extracts, 10 SlitORs were activated by at least one VOC (Table 1). These 10 SlitORs were all activated by lilac VOCs, whereas compounds from other plant headspaces activated a more limited number of SlitORs. At an extreme, VOCs from clover and maize only activated SlitOR28.

Table 1. Summary of the plant headspaces found to be active on SlitORs. Orange: at least one active VOC identified in the headspace. Red: at least one of the active VOCs is a novel ligand for the receptor. Grey: not tested.

		SlitOR 3	SlitOR 4	SlitOR 17	SlitOR 24	SlitOR 25	SlitOR 28	SlitOR 29	SlitOR 32	SlitOR35	SlitOR 36
Nectar source	Lilac										
Host plants	Clover										
	Maize										
	Cowpea										
	Cabbage										
	Cotton										
Damaged host plant	Damaged cotton										
Non-host plants	Malabar nut										
	Spruce										

Using GC-MS, we attempted to identify all the compounds within the extracts that triggered OR responses. Although some active compounds could not be unambiguously identified, most of the GC peaks correlating with SSR responses corresponded to ligands already identified for the corresponding SlitOR (de Fouchier et al. 2017). For example, the broad activation of SlitOR28 was due to the presence of (*Z*)3-hexenyl acetate, already identified as a ligand for this receptor, within each of the headspaces.

For six receptors (SlitOR4, 17, 29, 32, 35 and 36), we observed SSR responses linked to GC peaks in different extracts that did not correspond to previously identified ligands (Table 1 and Figure 1). These newly identified OR ligands were 1,8-cineole (a terpene also known as eucalyptol, found in the spruce headspace and active on SlitOR4 with a very high response

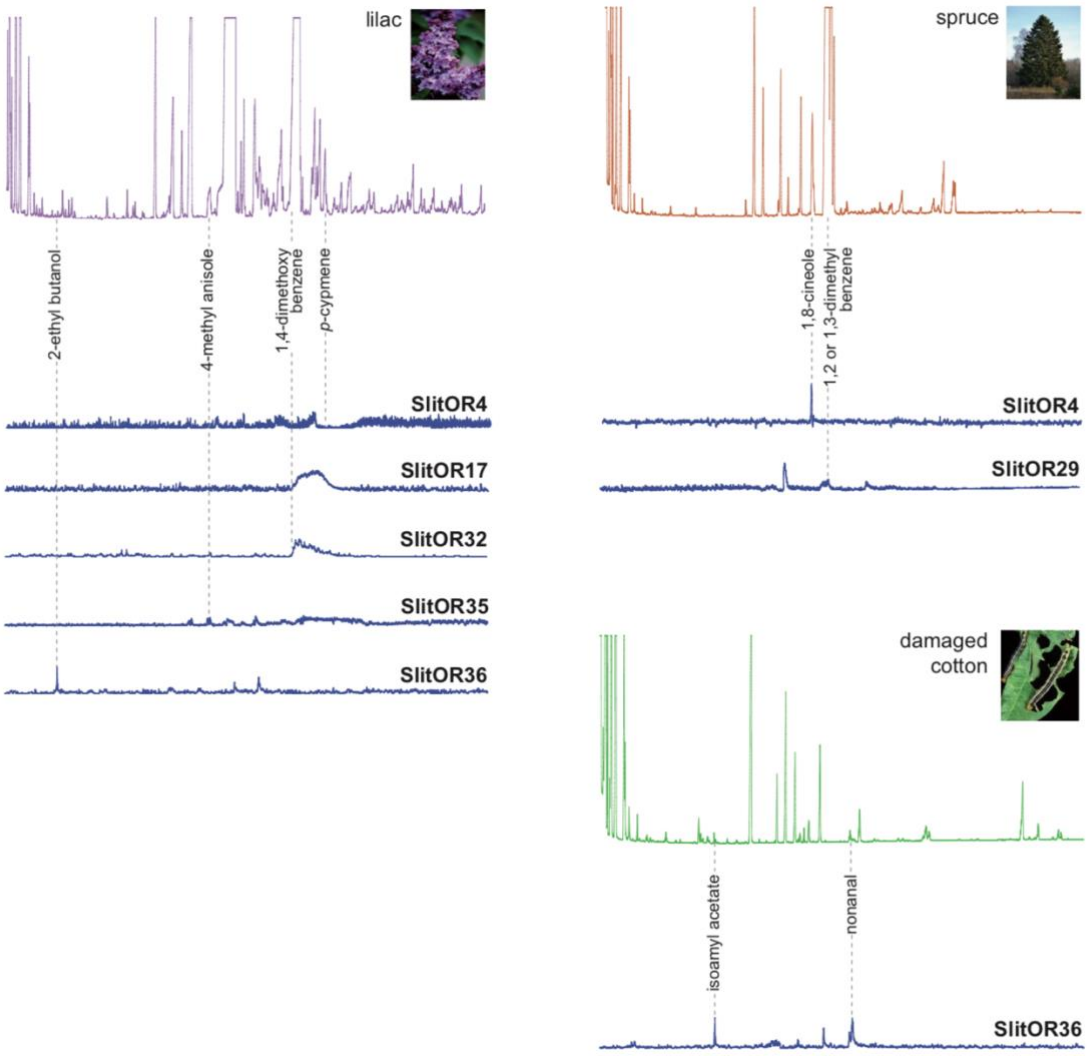


Figure 1. Gas chromatography-linked SSR profiles of SlitOR-expressing *Drosophila* ab3A OSNs, highlighting the responses to newly identified ligands.

intensity of >120 spikes/s), 1,2- or 1,3-dimethylbenzene (spruce, active on SlitOR29), nonanal and isoamyl acetate (damaged cotton, both active on SlitOR36), p-cymene, 1,4-dimethoxybenzene, 4-methylanisole and 2-ethylbutanol (lilac, active on SlitOR4, 32, 35 and 36, respectively). Synthetic products corresponding to these nine compounds were analysed by GC-MS and their retention time and mass spectra were compared to those obtained via GC-MS from plant extracts (not shown). Retention times and spectra matched, confirming our identification.

Validation of novel SlitOR ligands using SSR

To verify whether these nine compounds were indeed novel SlitOR ligands, we performed SSR experiments on the same *Drosophila* lines expressing SlitORs in their ab3 OSNs, but using

synthetic compounds. This confirmed that all the compounds identified here were indeed ligands of the corresponding receptors (Figure 2 and 3).

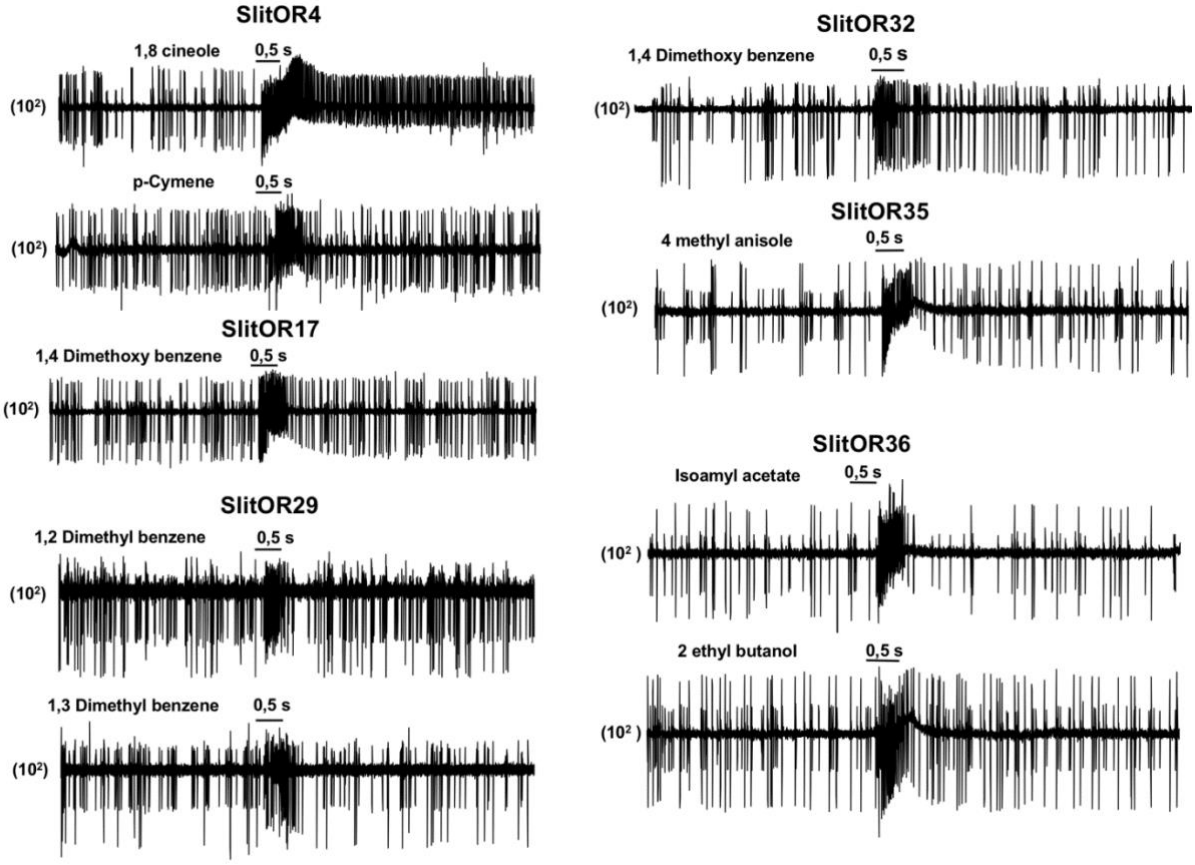


Figure 2. **Representative SSR responses of SlitOR-expressing *Drosophila* ab3A OSNs to newly identified ligands.**

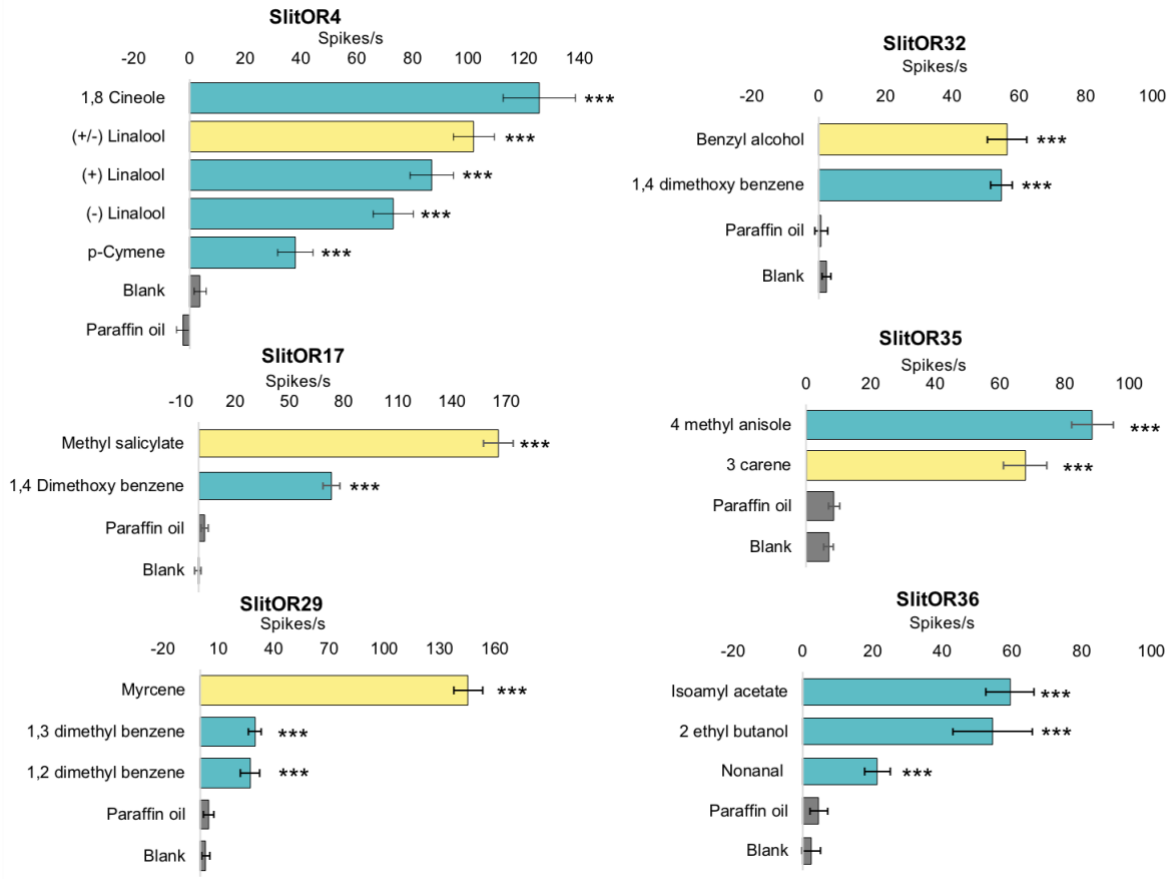


Figure 3. Comparison of SSR responses of SlitOR-expressing *Drosophila* ab3A OSNs to formerly and newly identified ligands. Former ligands (yellow bars) were: SlitOR4: linalool, SlitOR17: methyl salicylate, OR29: myrcene, OR32: benzyl alcohol, OR35: 3 carene, OR36: not shown (de Fouchier et al. 2017). New identified ligands are represented by the aqua green bars. Grey bars represent the controls. Dilutions: 10^{-2}. ***: statistically significant differences between responses to the odorant and to the solvent (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test. ***$p < 0.001$, $n = 10$.

For SlitOR4, the terpene 1,8-cineole turned out to be a more potent activator than the racemic (+/-)-linalool, previously identified as the best ligand. *p*-Cymene also activated this receptor but with a lower response frequency compared to other ligands. Similarly for SlitOR35, the newly identified 4-methylanisole induced stronger responses than the previously identified 3-carene. For the other four receptors, the newly identified ligands were validated but they induced lower responses the best known ligands. SlitOR17 and SlitOR32 responded well to the aromatic 1,4-dimethoxybenzene, found in the lilac headspace. SlitOR36 was activated by the aliphatic compounds isoamyl acetate, 2-ethylbutanol and nonanal, and SlitOR29 was moderately activated by the aromatics 1,2- and 1,3-dimethylbenzene (Figures 2 and 3).

Discussion

Using a pre-defined odorant panel, ligands have been previously identified for a large set of *S. littoralis* ORs (de Fouchier et al. 2017). This pioneering work in Lepidoptera has been a major step forward in understanding how olfactory signals are decoded at the peripheral level. Nevertheless, the compounds tested in this study were chosen based on VOCs described in the litterature as physiologically and behaviorally active (Saveer et al. 2012, Zakir et al. 2013, Borrero-Echeverry et al. 2015, Kromann et al. 2015). Although some were defined as the "best ligand" for a given OR, and in view of the limited panel used (~50 compounds), the existence of yet unknown "better" ligands could not be excluded. Such information is however essential to better understand olfactory-based host plant selection in herbivorous insects and to identify ecologically-relevant cues. To address this issue, we developed here an original approach combining GC-SSR and heterologous OR expression in the *Drosophila* empty neuron system. With this approach, it is possible to challenge a given OR with all the components of a plant headspace delivered via GC, without any pre-selection.

To possibly extend the response spectra of *S. littoralis* ORs, we selected several ecologically-relevant plants for adults of this species. With these plant headspaces, we could identify nine novel ligands for six SlitORs. Since they have been identified from a host plant, a non-host plant and nectar source, these VOCs probably play different roles in feeding and oviposition behaviours in adults, but they may also be relevant for the larvae. Indeed, three out of the six SlitORs (SlitOR4, 32 and 36) have been shown to be expressed not only in adults but also in fourth-instar larvae, according to a recent transcriptomic analysis performed on chemosensory organs from *S. littoralis* fourth-instar larvae (Caballero-Vidal *et al*., in prep). Since lepidopteran larvae can use chemical cues to orient towards host plants and to avoid competition or predators (Anderson et al. 1993, Zakir et al. 2013, Binyameen et al. 2014, de Fouchier et al. 2018), further behavioural studies would be of interest to understand the biological significance of these newly identified SlitOR ligands.

Among the newly identified ligands found here, the most potent one was 1,8-cineole (eucalyptol), which is now the best ligand identified for SlitOR4. This was identified in the headspace from spruce, a non-host plant for *S. littoralis*. However, the behavioral effect of 1,8-cineole on *S. littoralis* is unknown. This VOC is a repellent for neonate larvae of the codling moth *Cydia pomonella* (Landolt et al. 1999) and other moths larvae (Koul et al. 2013) and repels feeding and oviposition in the mosquito *Aedes aegypti* (Klocke et al. 1987), but its role in the chemical ecology of herbivorous insects remains largely unexplored, to our knowledge. The other novel SlitOR4 ligand (identified in lilac) was p-Cymene, previously reported as the major compound in tansy flowers (*Tanacetum vulgare*), which have a deterrent effect on oviposition and inhibit the mating behavior in the moth *Lobesia botrana* (Gabel and Thiéry 1994). It has been also shown that extract of tansy exerted antifeedant effects on *Pieris rapae* third instar larvae, and substantially reduced oviposition in *Plutella xylostella* females (Hough-Goldstein and Hahn 1992). Interestingly, detection of 1,8-cineole and p-cymene by *S. littoralis* OSNs was not revealed by previous exhaustive electrophysiological analyses carried out using SSR and GC-SSR (Binyameen et al.

2012, 2014). This exemplifies how studies on heterologously expressed ORs can help to better apprehend the diversity of molecules detected by an insect.

SlitOR32, a receptor also expressed at both larvae and adult stages, was activated by 1,4-dimethoxybenzene, an aromatic compound present in high amounts in the lilac headspace. This compound has been found in many different plant species (*e.g* major compound in the wild strawberry *Fragaria vesca, Iris planifolia* and *Salix caprea* flowers) (Wibe et al. 2014, Zito et al. 2019). Jürgens et al. (2014) performed GC-EAD and behavioral assays on *Apis mellifera* and the moth *Orthosia gothica,* showing that both insects responded to nearly the same set of floral compounds, differing only in the strength of response. *A. mellifera* and other diurnal insects presented a strong preference for 1,4-dimethoxybenzene, whereas nocturnal insects such as the moth *O. gothica* were more attracted to lilac aldehydes (Dötterl et al. 2005, Jürgens et al. 2014). This main attraction for aldehydes was also shown in *S. littoralis* by Saveer et al. (2012). The 1,4-dimethoxybenzene is also used in traps to enhance monitoring of crop pest insects such as the weevil *Anthonomus rubi* (Wibe et al. 2014). Thus, it can be considered as a promising compound in terms of pest control, however, there is a lack of information concerning the effect of this molecule on phytophagous larvae.

Two novel ligands were identified in this study for SlitOR36: 2-ethylbutanol and isoamyl acetate, found in lilac flower and damaged-cotton plant extracts, respectively. Compounds similar to 2-ethylbutanol also activate OSNs from different species of Coleoptera (Mitchell et al. 2012, Germinara et al. 2019) . Isoamyl acetate, commonly found on banana fruit, is also the most active compound in bees alarm pheromone (Boch et al. 1962, Stensmyr et al. 2003). *Drosophila* larvae showed high attraction for this compound in chemotaxis behavioral experiments (Fishilevich et al. 2005). Hitherto, its effect on herbivorous insects (either adults or larvae) remains largely unknown.

The other three ORs (SlitOR17, 29 and 35) for which new ligands were identified on this study are expressed only in adult *S. littoralis*. The corresponding ligands were already proven to be detected by *S. littoralis* OSNs (Binyameen et al. 2014). SlitOR17 is a receptor to aromatics, for which the best ligand identified so far was methyl salicylate. In our study we identified 1,4-dimethoxybenzene as another SlitOR17 ligand, which yielded a lower neuron activation rate than other aromatic compounds described previously (de Fouchier et al. 2017). Information about the sensitivity of this receptor toward different aromatic compounds gives important details to the understanding of OR specificity for particular chemical classes. SlitOR29 was activated by two novel VOCs from the spruce extract, 1,2-dimethylbenzene (o-xylene) and 1,3-dimethylbenzene (m-xylene). These compounds are also present in plants such as the dandelion (*Taraxacum officinale*) or in the leaf trichomes of the squash (*Cucurbita pepo*). In the latter, it plays an important role in the attraction and oviposition of gravid females of the pickleworm moth *Diaphania nitidalis* (Peterson et al. 1994, Bylka et al. 2010). In the present study, 1,2- and 1,3-dimethylbenzene only slightly activated the receptor compared to β-myrcene that was previously shown as very active on SlitOR29 (de Fouchier et al. 2017). SlitOR35 was highly activated by 4-methylanisole, an aromatic compound found in the lilac flower headspace (also reported as a compound from ylang ylang *Cananga odorata* and *Mimusops elengi* flowers).

In this study, we identified novel ligands from volatile collections from leaves and flowers of host and non-host plants using a combined method allowing 1) odorant separation and identification from different blends and 2) recording of neuronal responses simultaneously. This technique

allowed us to expand the ligand repertoire for SlitORs, enabling the identification of natural ligands in a more efficient context. Although it is clear that behavioral studies have to be conducted to verify the role of these compounds in mediating host attraction or repulsion in *S. littoralis*, the information obtained in this study will help to elucidate how *S. littoralis* OSNs may encode the quality of molecules from host and non-host plants.

Acknowledgements

This work has been funded by INRAE, Sorbonne Université, the French National Research Agency (ANR-09-BLAN-0239-01, ANR-16-CE21-0002-01, ANR-16-CE02-0003-01), the Swedish Science Council (#621-2009-5160 and the Linnaeus initiative grant 'Insect Chemical Ecology, Ethology and Evolution' IC-E3 #217-2006-1750: The Swedish Research Council, FORMAS and SLU), the Trygger Foundation (CTS 10: 166), the Olle Engkvist foundation (2013.4.1-766), the Max Planck Society and the Higher Education Commission (HEC), Pakistan. BECAL and the National Council of Science and Technology of Paraguay.

Author Contributions

G.C-V.: Data curation, Investigation, Writing original draft; C.S., A.d.F., G.B., M.B., C.M., W.B.W: Data curation, Investigation, M.C.L., E.J-J., N.M., F.S., P.A., W.B.W.: Conceptualization, Funding acquisition, Writing review & editing.

Competing interests

The authors declare no competing interests**.**

References

Anderson, P., M. Hilker, B. S. Hansson, S. Bombosch, B. Klein, and H. Schildknecht. 1993. Oviposition deterring components in larval frass of Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae): A behavioural and electrophysiological evaluation. Journal of Insect Physiology 39:129–137.

Bengtsson, J. M., Y. Wolde-Hawariat, H. Khbaish, M. Negash, B. Jembere, E. Seyoum, B. S. Hansson, M. C. Larsson, and Y. Hillbur. 2009. Field attractants for Pachnoda interrupta selected by means of GC-EAD and single sensillum screening. Journal of Chemical Ecology 35:1063–1076.

Bengtsson, M., A. C. Bäckman, I. Liblikas, M. I. Ramirez, A. K. Borg-Karlson, L. Ansebo, P. Anderson, J. Löfqvist, and P. Witzgall. 2001. Plant odor analysis of apple: Antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:3736–3741.

Benton, R., S. Sachse, S. W. Michnick, and L. B. Vosshall. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. PLoS Biology 4:240–257.

Binyameen, M., P. Anderson, R. Ignell, G. Birgersson, M. Razaq, S. A. Shad, B. S. Hansson, and

F. Schlyter. 2014. Identification of Plant Semiochemicals and Characterization of New Olfactory Sensory Neuron Types in a Polyphagous Pest Moth , Spodoptera littoralis:719–733.

Binyameen, M., P. Anderson, R. Ignell, M. A. Seada, M. Planck, and C. Ecology. 2012. Spatial Organization of Antennal Olfactory Sensory Neurons in the Female Spodoptera littoralis Moth : Differences in Sensitivity and Temporal Characteristics:613–629.

Binyameen, M., A. Hussain, F. Yousefi, G. Birgersson, and F. Schlyter. 2013. Modulation of Reproductive Behaviors by Non-Host Volatiles in the Polyphagous Egyptian Cotton Leafworm, Spodoptera littoralis. Journal of Chemical Ecology 39:1273–1283.

Boch, R., D. A. Shearer, and B. C. Stone. 1962. Identification of Iso-Amyl Acetate as an Active Component in the Sting Pheromone of the Honey Bee. Nature 195:1018–1020.

Borrero-Echeverry, F., P. G. Becher, G. Birgersson, M. Bengtsson, P. Witzgall, and A. M. Saveer. 2015. Flight attraction of Spodoptera littoralis (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. Frontiers in Ecology and Evolution 3:1–7.

Bruce, T. J. A., L. J. Wadhams, and C. M. Woodcock. 2005. Insect host location: a volatile situation. Trends in plant science 10:269–74.

De Bruyne, M., and T. C. Baker. 2008. Odor detection in insects: Volatile codes. Journal of Chemical Ecology 34:882–897.

Bylka, W., I. Matlawska, and R. Frański. 2010. Essential oil Composition of Taraxacum officinale. Acta Physiologiae Plantarum 32:231–234.

Carey, A. F., G. Wang, C. Y. Su, L. J. Zwiebel, and J. R. Carlson. 2010. Odorant reception in the malaria mosquito Anopheles gambiae. Nature 464:66–71.

Conchou, L., P. Anderson, and G. Birgersson. 2017. Host Plant Species Differentiation in a Polyphagous Moth: Olfaction is Enough. Journal of Chemical Ecology 43:794–805.

Corcoran, J. A., M. D. Jordan, C. Carraher, and R. D. Newcomb. 2014. A novel method to study insect olfactory receptor function using HEK293cells. Insect Biochemistry and Molecular Biology 54:22–32.

Dobritsa, A. A., W. van der Goes van Naters, C. G. Warr, R. A. Steinbrecht, and J. R. Carlson. 2003. Integrating the Molecular and Cellular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Neuron 37:827–841.

Dötterl, S., U. Füssel, A. Jürgens, and G. Aas. 2005. 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. Journal of Chemical Ecology 31:2993–2998.

Fishilevich, E., A. I. Domingos, K. Asahina, F. Naef, L. B. Vosshall, and M. Louis. 2005. Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in Drosophila. Current Biology 15:2086–2096.

Forstner, M., H. Breer, and J. Krieger. 2009. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth Antheraea polyphemus. International Journal of Biological Sciences 5:745–757.

de Fouchier, A., N. Montagné, O. Mirabeau, and E. Jacquin-Joly. 2014. Current views on the function and evolution of olfactory receptors in Lepidoptera. Pages 385–408 Short views on Insect Biochemistry and Molecular Biology.

de Fouchier, A., X. Sun, G. Caballero-Vidal, S. Travaillard, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2018. Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant

Receptors. Frontiers in Behavioral Neuroscience 12:264.
de Fouchier, A., W. B. Walker, N. Montagné, C. Steiner, M. Binyameen, F. Schlyter, T. Chertemps, A. Maria, M.-C. François, C. Monsempes, P. Anderson, B. S. Hansson, M. C. Larsson, and E. Jacquin-Joly. 2017. Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. Page 15709 Nature Communications.
Gabel, B., and D. Thiéry. 1994. Non-host plant odor (Tanacetum vulgare; Asteracea) affects the reproductive behavior ofLobesia botrana Den. et Schiff (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Insect Behavior 7:149–157.
Germinara, G. S., M. Pistillo, R. Griffo, A. P. Garonna, and A. Di Palma. 2019. Electroantennographic responses of Aromia bungii (Faldermann, 1835) (Coleoptera, Cerambycidae) to a range of volatile compounds. Insects 10.
Große-Wilde, E., A. Svatoš, and J. Krieger. 2006. A Pheromone-binding protein mediates the bombykol-induced activation of a pheromone receptor in vitro. Chemical Senses 31:547–555.
Hallem, E. A., and J. R. Carlson. 2006. Coding of Odors by a Receptor Repertoire. Cell 125:143–160.
Hatano, E., A. M. Saveer, F. Borrero-Echeverry, M. Strauch, A. Zakir, M. Bengtsson, R. Ignell, P. Anderson, P. G. Becher, P. Witzgall, and T. Dekker. 2015. A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. BMC Biology 13:1–15.
Hough-Goldstein, J., and S. P. Hahn. 1992. Antifeedant and oviposition deterrent activity of an aqueous extract of Tanacetum vulgare L. on two cabbage pests. Environmental Entomology 21:837–844.
Jones, W. D., T.-A. T. Nguyen, B. Kloss, K. J. Lee, and L. B. Vosshall. 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. Current biology : CB 15:R119-21.
Jönsson, M., and P. Anderson. 1999. Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth Spodoptera littoralis. Physiological Entomology 24:377–385.
Jürgens, A., U. Glück, G. Aas, and S. Dötterl. 2014. Diel fragrance pattern correlates with olfactory preferences of diurnal and nocturnal flower visitors in Salix caprea (Salicaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 175:624–640.
Kiely, A., A. Authier, A. V. Kralicek, C. G. Warr, and R. D. Newcomb. 2007. Functional analysis of a Drosophila melanogaster olfactory receptor expressed in Sf9 cells. Journal of Neuroscience Methods 159:189–194.
Klocke, J. A., M. V. Darlington, and M. F. Balandrin. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of Hemizonia fitchii (Asteraceae). Journal of Chemical Ecology 13:2131–2141.
Koul, O., R. Singh, B. Kaur, and D. Kanda. 2013. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of Helicoverpa armigera, Spodoptera litura and Chilo partellus. Industrial Crops and Products 49:428–436.
Kreher, S. A., D. Mathew, J. Kim, and J. R. Carlson. 2008. Translation of Sensory Input into Behavioral Output via an Olfactory System. Neuron 59:110–124.
Kromann, S. H., A. M. Saveer, M. Binyameen, M. Bengtsson, G. Birgersson, B. S. Hansson, F.

Schlyter, P. Witzgall, R. Ignell, and P. G. Becher. 2015. Concurrent modulation of neuronal and behavioural olfactory responses to sex and host plant cues in a male moth. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 282.

Landolt, P. J., R. W. Hofstetter, and L. L. Biddick. 1999. Plant essential oils as arrestants and repellents for neonate larvae of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). Environmental Entomology 28:954–960.

Larsson, M. C., A. I. Domingos, W. D. Jones, M. E. Chiappe, H. Amrein, and L. B. Vosshall. 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. Neuron 43:703–714.

Leal, W. S. 2013. Odorant Reception in Insects : Roles of Receptors , Binding Proteins , and Degrading Enzymes. Annual Review of Entomology is 58:373–391.

Mitchell, R. F., D. T. Hughes, C. W. Luetje, J. G. Millar, F. Soriano-Agatón, L. M. Hanks, and H. M. Robertson. 2012. Sequencing and characterizing odorant receptors of the cerambycid beetle Megacyllene caryae. Insect Biochemistry and Molecular Biology 42:499–505.

Peterson, J. K., R. J. Horvat, and K. D. Elsey. 1994. Squash leaf glandular trichome volatiles: Identification and influence on behavior of female pickleworm moth [Diaphania nitidalis (Stoll.)] (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Chemical Ecology 20:2099–2109.

Renwick, J. A. A. 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. Experientia 45:223–228.

Rharrabe, K., E. Jacquin-Joly, and F. Marion-Poll. 2014. Electrophysiological and behavioral responses of Spodoptera littoralis caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. Frontiers in Ecology and Evolution 2:5.

Salama, H. S., N. Z. Dimetry, and S. A. Salem. 1971. On the Host Preference and Biology of the Cotton Leaf Worm Spodoptera littoralis Bois. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 67:261–266.

Saveer, A. M., S. H. Kromann, G. Birgersson, M. Bengtsson, T. Lindblom, A. Balkenius, B. S. Hansson, P. Witzgall, P. G. Becher, and R. Ignell. 2012. Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 279:2314–2322.

Smart, R., A. Kiely, M. Beale, E. Vargas, C. Carraher, A. V. Kralicek, D. L. Christie, C. Chen, R. D. Newcomb, and C. G. Warr. 2008. Drosophila odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38:770–780.

Stengl, M., and N. W. Funk. 2013. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 199:897–909.

Stensmyr, M. C., E. Giordano, A. Balloi, A.-M. Angioy, and B. S. Hansson. 2003. Novel natural ligands for Drosophila olfactory receptor neurones. Journal of Experimental Biology 206:715–724.

Tanaka, K., Y. Uda, Y. Ono, T. Nakagawa, M. Suwa, R. Yamaoka, and K. Touhara. 2009. Highly Selective Tuning of a Silkworm Olfactory Receptor to a Key Mulberry Leaf Volatile. Current Biology 19:881–890.

Wang, G. R., A. F. Carey, J. R. Carlson, and L. J. Zwiebel. 2010. Molecular basis of odor coding

in the malaria vector mosquito Anopheles gambiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:4418–4423.

Wibe, A., A. K. Borg-Karlson, J. Cross, H. Bichão, M. Fountain, I. Liblikas, and L. Sigsgaard. 2014. Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry Fragaria vesca, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil Anthonomus rubi improves attraction. Crop Protection 64:122–128.

Yuvaraj, J. K., M. N. Andersson, J. A. Corcoran, O. Anderbrant, and C. Löfstedt. 2018. Functional characterization of odorant receptors from Lampronia capitella suggests a non-ditrysian origin of the lepidopteran pheromone receptor clade. Insect Biochemistry and Molecular Biology 100:39–47.

Zakir, A., M. Bengtsson, M. M. Sadek, B. S. Hansson, P. Witzgall, and P. Anderson. 2013. Specific response to herbivore-induced de novo synthesized plant volatiles provides reliable information for host plant selection in a moth. Journal of Experimental Biology 216:3257–3263.

Zito, P., S. Rosselli, M. Bruno, A. Maggio, and M. Sajeva. 2019. Floral scent in Iris planifolia (Iridaceae) suggests food reward. Phytochemistry 158:86–90.

Chapitre 3 : Identification de nouveaux agonistes d'un récepteur olfactif chez une noctuelle ravageuse de cultures en utilisant la chimio-informatique

Introduction

La détection des molécules odorantes chez les insectes est réalisée au sein des organes olfactifs, principalement les antennes et les palpes. Ces organes expriment des récepteurs olfactifs (OR) qui sont responsables de la détection. Durant les dernières années, un grand nombre d'OR a été répertorié chez différentes espèces d'insectes. Cependant, le grand défi consiste à trouver les molécules activant ces récepteurs. Ce processus appelé « *déorphanisation* » est une étape critique, qui reste difficile à atteindre car l'espace odorant peut être infini, et il est impossible des tester toutes les combinaisons OR/ligand possibles.

Lorsque plusieurs ligands sont identifiés pour un OR, il est alors possible d'utiliser des méthodes de "machine learning" pour explorer un espace chimique virtuel très large et sélectionner de nouveaux ligands potentiels qui partagent les mêmes caractéristiques chimiques et pourraient activer l'OR d'intérêt. Ce processus de criblage virtuel a été utilisé pour prédire de nouveaux ligands pour des OR de mammifères et d'insectes.

Chez l'insecte, la prédiction de ligands *in silico* a surtout été utilisée chez les diptères, montrant que le taux de succès pour les ligands prédits varie entre 14 et 71% (Boyle et al. 2013; Zhang et al. 2013). Cette méthode est applicable aux récepteurs pour lesquels des données fonctionnelles sont déjà disponibles, et permet d'élargir la liste des molécules actives qui auront potentiellement un effet sur le comportement de l'insecte. Cela peut ainsi aider au développement de nouveaux attractifs/répulsifs d'insectes ou de composés qui masquent les odeurs utilisées par les insectes nuisibles pour identifier leurs hôtes.

Dans ce chapitre, la stratégie ligand-ciblée de prédiction *in silico* a été appliquée pour un OR de lépidoptère, le récepteur SlitOR25, deorphanisé par de Fouchier et al. (2017) et associé à un comportement attractif chez les chenilles de *Spodoptera littoralis* (de Fouchier et al. 2018). Ces caractéristiques ont fait de SlitOR25 un bon candidat pour explorer le potentiel de la stratégie de machine learning, qui, jusqu'à maintenant, n'a pas encore été utilisée en dehors des insectes modèles.

L'utilisation du « virtual screening » basé sur des descripteurs chimiques d'odorants a permis de prédire les interactions récepteur-odorant pour SlitOR25. Le criblage virtuel de plus de 3 millions de molécules a permis de proposer 90 candidats agonistes, dont 32 molécules disponibles

sur le marché. Des études fonctionnelles en utilisant le système *in vivo* du neurone vide chez la drosophile ont permis de tester ces 32 molécules sur SlitOR25, révélant 11 nouveaux agonistes. Nous avons donc obtenu un « taux de succès » de 28 % dans la prédiction des ligands actifs, démontrant qu'il s'agit d'une approche très prometteuse et utile pour explorer en détail les capacités de détection des OR. De plus, en l'absence de toute structure d'OR (sauf celle d'Orco), ce type de stratégie ouvre la voie à des analyses de relations structure-fonction à travers une comparaison des structures chimiques des agonistes.

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN

Machine learning decodes chemical features to identify novel agonists of a moth odorant receptor

Gabriela Caballero-Vidal[1,4], Cédric Bouysset[2,4], Hubert Grunig[2], Sébastien Fiorucci[2], Nicolas Montagné[1*], Jérôme Golebiowski[2,3*] & Emmanuelle Jacquin-Joly[1*]

Odorant receptors expressed at the peripheral olfactory organs are key proteins for animal volatile sensing. Although they determine the odor space of a given species, their functional characterization is a long process and remains limited. To date, machine learning virtual screening has been used to predict new ligands for such receptors in both mammals and insects, using chemical features of known ligands. In insects, such approach is yet limited to Diptera, whereas insect odorant receptors are known to be highly divergent between orders. Here, we extend this strategy to a Lepidoptera receptor, SlitOR25, involved in the recognition of attractive odorants in the crop pest *Spodoptera littoralis* larvae. Virtual screening of 3 million molecules predicted 32 purchasable ones whose function has been systematically tested on SlitOR25, revealing 11 novel agonists with a success rate of 28%. Our results show that Support Vector Machine optimizes the discovery of novel agonists and expands the chemical space of a Lepidoptera OR. More, it opens up structure-function relationship analyses through a comparison of the agonist chemical structures. This proof-of-concept in a crop pest could ultimately enable the identification of OR agonists or antagonists, capable of modifying olfactory behaviors in a context of biocontrol.

Animals are exposed in their environment to a plethora of odorant molecules from a variety of chemical structures. Some of these molecules contain valuable information to carry out essential activities such as the identification of food sources, oviposition sites, mating partners, conspecifics and predators. Animals detect odorants via olfactory sensory neurons (OSNs) housed in dedicated olfactory organs, and the mechanisms underlying this detection have been particularly well studied in insects and mammals[1]. In insects, the primary olfactory organs consist of the antennae and the maxillary palps, which are covered by olfactory sensilla that house the OSNs[2]. In mammals, OSNs are mainly localized within the olfactory epithelium of the nasal cavity. In both insects and mammals, large multigenic families of odorant receptor proteins (ORs) mediate odorant recognition, each OSN expressing a single receptor (plus Orco in insects, see below) that controls its detection spectrum. These ORs are seven-transmembrane (TM) domain receptors[3–5], yet mammalian and insect ORs belong to distinct unrelated families[6]. Mammalian ORs are members of the class A rhodopsin-like G protein–coupled receptors (GPCR)[7], whereas insect OR membrane topology is opposite to that of GPCRs, with a cytoplasmic N-terminus and an extracellular C-terminus[8]. Furthermore, insect ORs form heteromers with a well conserved coreceptor named Orco[8–10], and these heteromers are gated directly by chemical stimuli[11].

Understanding how the OR repertoire of an animal contributes to odor sensing and adaptation to a specific environment relies on the capacity to identify natural ligands of these ORs, a process called deorphanization. Yet, the ligands of several mammalian and insect ORs have been identified using different expression systems[12–19]. However, the number of chemicals used to stimulate the ORs is limited due to practical handling and duration of the experimentation. Consequently, potential stimuli that are tested on ORs of a given species are generally only a small portion of the vast array of ecologically relevant odorants. In insects, such sets of potential stimuli consisted of up to 100 molecules used to challenge *Drosophila melanogaster*[19] (even up to 500 in one study but with only one replicate[20]) and *Anopheles gambiae* ORs[16,17], but only fifty have been used to stimulate the ORs of a

[1]INRAE, Sorbonne Université, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Diderot, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris, Versailles, France. [2]Institute of Chemistry of Nice, UMR CNRS 7272, Université Côte d'Azur, Nice, France. [3]Department of Brain and Cognitive Sciences, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology, Daegu, 711-873, South Korea. [4]These authors contributed equally: Gabriela Caballero-Vidal and Cédric Bouysset. *email: nicolas.montagne@sorbonne-universite.fr; jerome.golebiowski@unice.fr; emmanuelle.joly@inrae.fr

moth, *Spodoptera littoralis*[18]. Given that the potential odor space for an animal is almost unlimited, it is likely that the main ligand(s) of some deorphanized ORs still remains unidentified. The problem of selecting the candidate molecules to be tested becomes even more critical when trying to identify agonists or antagonists of particular ORs that are not natural ligands but could have an impact on the behavior of pest and disease vector insects[21].

Several recent studies revealed that the application of machine learning in the context of virtual screening opens up the possibility to enlarge animal odor spaces. Machine learning based on odorant chemical descriptors allowed predicting receptor–odorant interactions in both insects[22–25] and mammals[26], although their ORs do not belong to the same protein families. Notably, quantitative structure-activity relationship (QSAR) is an *in silico* ligand-based method used to predict biological activity of untested chemicals, based on chemical features shared by active molecules[27]. In *D. melanogaster*, virtual screening of more than 240,000 chemical structures identified a large array of novel OR activators and inhibitors[25]. An *in silico* screening of 0.5 million compounds identified agonists or antagonists targeting the mosquito CO_2 receptor, leading to the discovery of new attractants and repellents for those harmful disease vectors[24]. More recently, antagonists for the insect coreceptor Orco have been identified by screening a library of 1280 odorant molecules[28]. In mammals, a more modest virtual screening of 258 chemicals anyhow identified new agonists of four human ORs[26]. Although efficient, this approach requires prior knowledge on the response spectrum of a given OR and its application has thus been restricted to model species with cumulative odorant-receptor functional data.

We have recently deorphanized a large array of ORs in the noctuid moth *Spodoptera littoralis* through heterologous expression in *Drosophila* OSNs[18]. This offers an unprecedented opportunity to test such a computational approach in a non-dipteran insect. *Spodoptera littoralis* is a polyphagous moth[29] present in Africa, the Middle East and Southern Europe[30]. At the larval stage, *S. littoralis* is responsible for extensive damage in a large number of crops of economic importance[29]. Establishing machine learning virtual screening efficiency in such an herbivorous pest species will open new routes for the identification of possible agonists and antagonists to be used in biocontrol strategies. In addition, screening structurally related molecules can bring crucial information to determine structure-function relationships. Here, we focused on *S. littoralis* OR25 (SlitOR25), an odorant receptor that is particularly suitable for this approach. Over a panel of 52 volatile organic compounds, SlitOR25 is strongly activated by nine agonists and moderately activated by four[18]. Also, it is expressed at both larval and adult stages and its activation has been correlated with caterpillar attraction[31]. Based on properties of the previously identified SlitOR25 ligands, we carried out an *in silico* screening of a chemical space of more than three million chemicals, leading to the prediction of 90 potential agonists, of which 32 were commercially available. The activity of these 32 compounds was further functionally tested on SlitOR25 expressed in *Drosophila* OSNs. We revealed enrichment of SlitOR25 agonists, with a hit rate of 28%. With the current lack of any OR structure - apart that of Orco[32]-, this machine-learning protocol based on chemical molecular descriptors thus represents an efficient tool for addressing ligand structure-function relationship in addition to identifying novel unexpected ligands for moth ORs, extending their odor space outside the presupposed relevant odorants.

Results and Discussion

In silico prediction of SlitOR25 agonists. First, the published SlitOR25 chemical space[18] was analyzed through calculation of its known ligand chemical descriptors and projection on the *Drosophila melanogaster* Database of Odorant Responses (DoOR v2.0)[33], considered as prototypical. Figure 1a simplifies this chemical space using a t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) algorithm in two dimensions. Agonists were split into two distinct clusters, suggesting that a machine learning model (Fig. 1b) should be able to identify rules to separate them from non-agonists (see Supplementary Table S1 for a list of the considered molecules). Then, the external dataset to be screened was obtained by filtering ~90 million molecules from the PubChem database as described in the method section. More than three million molecules corresponding to organic potentially volatile molecules were extracted and were evaluated by the optimized Support Vector Machine (SVM). After an additional filter associated with the applicability domain obtained by a similarity search with the known agonists, 90 molecules were predicted as agonists (Fig. 1c and Supplementary Table S2). The performance of the SVM is resumed in Table 1 and Supplementary Table S3.

Effect of predicted agonists on SlitOR25 activity. Among the predicted novel agonists of SlitOR25, 32 molecules were commercially available at high purity (Table 2). These molecules were mainly fluorinated derivatives of known ligands (acetophenone, benzyl alcohol, benzaldehyde). To verify whether these were indeed agonists of SlitOR25, we performed single-sensillum recordings on *D. melanogaster* flies expressing SlitOR25 in ab3A OSNs instead of the endogenous receptor OR22a, a heterologous expression system known as the "empty neuron"[34]. A first screen with a high concentration of the 32 candidate agonists (10^{-2} dilution) revealed that nine of them elicited a significant response ($p < 0.05$, Fig. 2), representing a 28% success rate. For comparison, 30% of 138 *in silico* predicted odorants activated the mosquito CO_2 receptor in a first round[24]. Machine learning models based on ligand topology predicted 138 antagonists for mosquito Orco, out of which 45 were active (32%)[28]. In this last study, it has to be noticed that 58 active antagonists were used to feed the machine learning, a number that is much higher than the 13 ligands we used. In *Drosophila*, another study revealed that the success rate of an optimized QSAR greatly depends on the receptor (varying from 27% to 71%)[25] and that lowest rates were obtained for ORs tuned to aromatics (around 30%). Here, we add new evidences that machine learning is of great help to discover novel ligands for Lepidoptera ORs.

Looking in detail at the new ligands identified for SlitOR25, none presented a reverse agonist activity (reduction of spontaneous activity), whereas this has been observed for 13% of predicted ligands for *D. melanogaster* ORs when tested on OSNs[25]. This is likely attributed to the nature of the screened receptor, where reverse agonists would be part of a far-removed chemical space compared to agonists. However, with the current lack of

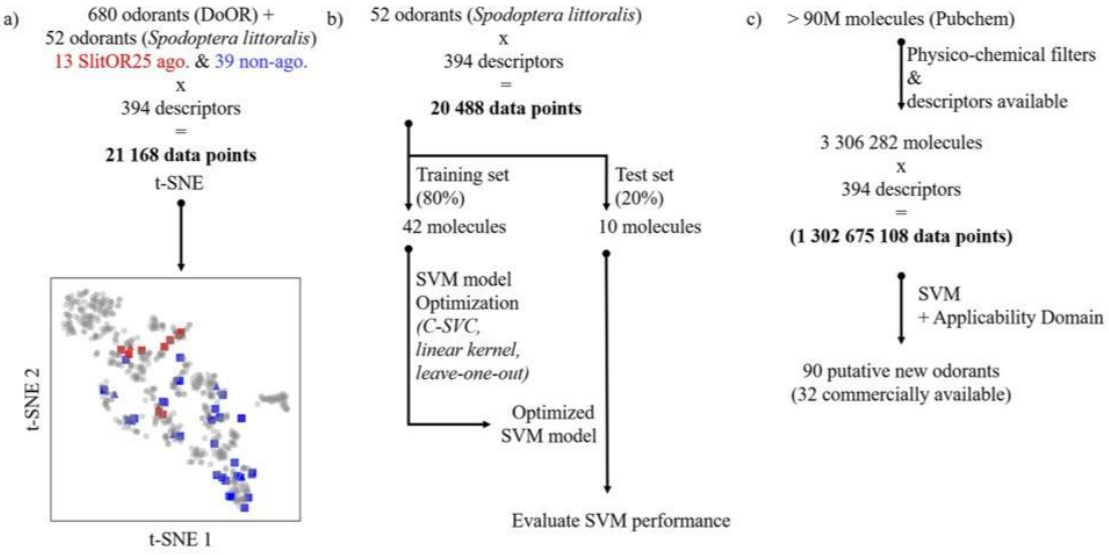


Figure 1. Analysis of insect odorant molecular space and protocol used for *Spodoptera littoralis* OR25 (SlitOR25) virtual screening. **(a)** Visualization of SlitOR25 and *Drosophila melanogaster* olfactory chemical spaces based on a t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) dimensionality reduction method. The agonists (ago) and non-agonists (non-ago) of SlitOR25 are shown in red and blue, respectively, and agonists of *D. melanogaster* are shown in gray. Chemicals of the training set are shown in squares while those of the test set are shown as triangles **(b)** Workflow of the Support Vector Machine (SVM) model based on an 80%/20% split of the initial database. Forty-two molecules constituting the training set were used to find optimized SVM parameters while 10 molecules were kept for a blind evaluation by the optimized SVM (Supplementary Table S1). C-SVC: C-Support Vector Classification. **(c)** Virtual screening of more than three million molecules extracted from the PubChem database resulted in 90 agonist candidates.

Dataset	%CC	Precision	Recall	MCC
Training	0.90 ± 0.03	0.77 ± 0.05	0.84 ± 0.08	0.77 ± 0.07
Test	0.92 ± 0.06	0.88 ± 0.16	0.91 ± 0.12	0.83 ± 0.12

Table 1. Five-fold random split Support Vector Machine performance metrics. %CC: percentage of instances correctly classified, MCC: Matthews Correlation Coefficient.

any structure of an insect OR (apart that of Orco)[32], providing a mechanistic view on the way agonists work is extremely difficult.

Dose-response analyses. To compare the responses evoked on SlitOR25 by the nine newly identified agonists to those evoked by the previously known natural ligands, we conducted dose-response SSR experiments, using dilutions ranging from 10^{-7} to 10^{-2}, and effective doses 50 (ED50s) were calculated. Statistical analyses for the responses of all molecules tested in dose-response are detailed in Table 3. For predicted molecules structurally related to the ligand acetophenone (Fig. 3a), statistically significant responses ($p < 0.05$) were observed for all tested molecules from 10^{-6} dilution. For the newly predicted ligands structurally related to benzaldehyde (Fig. 3b), detection thresholds varied from 10^{-7} (2,6-difluorobenzaldehyde) to 10^{-4} (2-fluorobenzaldehyde) dilution, whereas that of benzaldehyde was 10^{-6}. The predicted agonist 2-fluorobenzyl alcohol exhibited a higher activation threshold than the structurally related-known ligand benzyl alcohol (Fig. 3c). Our results demonstrated that machine learning was very efficient in identifying new strong ligands for SlitOR25.

Independent of the pharmacophore approach and by visually inspecting the structures, the presence of a Fluor atom at the ortho position in the ring (position 2) maintains the agonist behaviour for the three chemical families (aldehydes, ketones, alcohol). Multiple fluorinations had either a weak beneficial effect on benzaldehyde derivatives or decreased or abolished the response in other series (Supplementary Fig. S1).

The predicted molecules we functionally tested present strongly intertwined chemical spaces. The functional assays we conducted revealed that some were strong agonists and other were non-agonists (Supplementary Fig. S1), allowing us to tentatively recapitulate the features required for being an agonist through a pharmacophore approach (Supplementary Fig. S2). However, the model was not able to discriminate agonist from non-agonists based on the position of the Fluor atom on the aromatic cycle.

Compounds	CAS	Provider	Purity
1-Naphthaldehyde	66-77-3	Alfa Aesar	97%
2′-Fluoroacetophenone	445-27-2	Alfa Aesar	97%
Phenylglyoxal monohydrate	1074-12-0	Acros organics	97%
Terephthalaldehyde	623-27-8	Alfa Aesar	98%
Isophthalaldehyde	626-19-7	Alfa Aesar	98%
1,3-benzenedimethanol	626-18-6	Alfa Aesar	98%
2-Fluorobenzaldehyde	446-52-6	Alfa Aesar	97%
2-Fluorobenzyl alcohol	446-51-5	Alfa Aesar	98%
4-Fluorobenzaldehyde	459-57-4	Alfa Aesar	98%
4-Fluorobenzyl alcohol	459-56-3	Alfa Aesar	97%
3,4-Difluorobenzaldehyde	34036-07-2	Alfa Aesar	98%
3,4-Difluorobenzyl alcohol	85118-05-4	Alfa Aesar	99%
2,3,4-Trifluorobenzyl alcohol	144284-24-2	Alfa Aesar	97%
Salicylic acid	69-72-7	VWR chemicals	98%
3-Fluorobenzyl alcohol	456-47-3	Alfa Aesar	98%
3- Fluorobenzaldehyde	456-48-4	Alfa Aesar	97%
2,5-Difluorobenzaldehyde	2646-90-4	Alfa Aesar	98%
2,6-Difluorobenzaldehyde	437-81-0	Alfa Aesar	97%
3,5-Difluorobenzyl alcohol	79538-20- 8	Alfa Aesar	97%
3,5-Difluorobenzaldehyde	32085-88-4	Alfa Aesar	97%
2,4-Difluorobenzyl alcohol	56456-47-4	Alfa Aesar	98%
2,4-Difluorobenzaldehyde	1550-35-2	Alfa Aesar	98%
2,3-Difluorobenzaldehyde	2646-91-5	Alfa Aesar	98%
3,4,5-Trifluorobenzyl alcohol	220227-37-2	Alfa Aesar	97%
2,4,5-Trifluorobenzyl alcohol	144284-25-3	Alfa Aesar	98%
1,3-Indanedione	606-23-5	Alfa Aesar	97%
p-tolualdehyde	104-87-0	Alfa Aesar	98%
4′-Fluoroacetophenone	403-42-9	Alfa Aesar	99%
2′,4′-Difluoroacetophenone	364-83-0	Alfa Aesar	98%
2-Methoxybenzoic acid	579-75-9	Alfa Aesar	98%
2,3-Difluorobenzyl alcohol	75853-18- 8	Alfa Aesar	97%
2,5-Difluorobenzyl alcohol	75853-20- 2	Alfa Aesar	98%
Benzaldehyde	100-52-7	Sigma-Aldrich	99,5%
Z-3-hexenol	928-96-1	Sigma-Aldrich	98%
Methyl salicylate	119-36-8	Sigma-Aldrich	99%
2-phenyl acetaldehyde	122-78-1	Sigma-Aldrich	98%
Benzyl methyl ether	538-86-3	Sigma-Aldrich	98%
Methyl benzoate	93-58-3	Acros organics	97%
Benzyl alcohol	100-51-6	Sigma-Aldrich	99%
Acetophenone	98-86-2	Acros organics	99%
E-2-hexenol	928-95-0	Sigma-Aldrich	96%
E-2-hexenal	6728-26-3	Sigma-Aldrich	98%
1-hexanol	111-27-3	Sigma-Aldrich	98%
1-heptanol	111-70-6	Sigma-Aldrich	99%

Table 2. Predicted agonists (this study) and known ligands[18] (in bold) tested on SlitOR25.

Alternatively, a statistical analysis of the descriptors able to discriminate between agonists and non-agonists revealed 105 descriptors out of the 394 processed initially. These descriptors can either be constitutional, topologic, or electronic. They are challenging to interpret but could serve as a basis for a further screening protocol.

Conclusion

Machine learning widens the chemical space of a moth odorant receptor. In this study, we have used machine learning to predict novel agonists for SlitOR25, a broadly tuned receptor in the Lepidoptera *S. littoralis*. A Support Vector Machine was fed with 52 ligands for which the activity was already reported. After optimization, a database of more than 90 million chemicals was filtered and screened. Out of the three million of potentially useful molecules, 90 were predicted as agonists, of which 32 were commercially available. *In vivo* functional assays and dose-response analyses on these latter assessed nine novel molecules as moderate or strong agonists for the receptor.

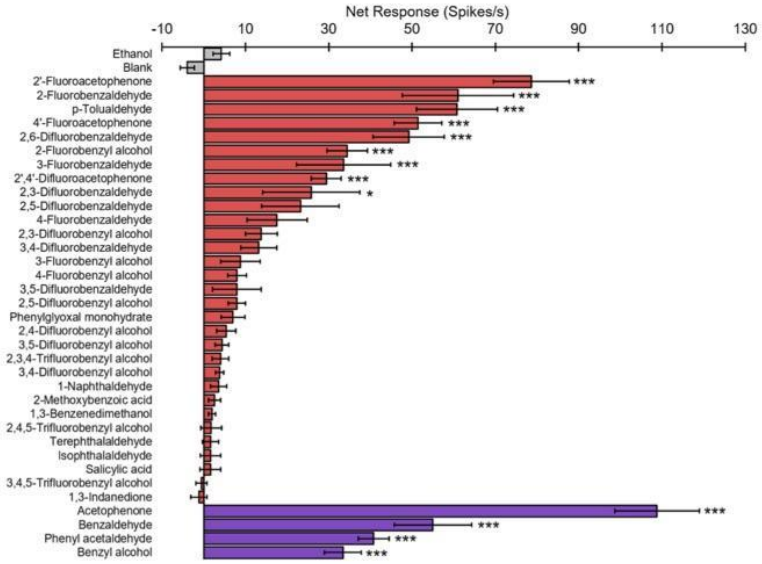


Figure 2. Response of *Drosophila* ab3A OSNs expressing SlitOR25 to 32 candidate ligands predicted via ligand-based QSAR approach. Responses are presented ± s.e.m. Grey bars: controls (ethanol solvent, blank). Red bars: predicted compounds tested in SSR at high doses (10^{-2}, ethanol dilution). Purple bars: known SlitOR25 ligands used as positive controls[18] (10^{-2}, ethanol dilution). Asterisks indicate statistically significant differences between responses to the odorant and to the solvent (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test, *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$, $n = 10$).

	Dilutions					
Tested molecules	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Acetophenone	NS	***	***	***	***	***
Benzyl alcohol	NS	NS	NS	***	***	***
Benzaldehyde	NS	***	***	***	***	***
2′-Fluoroacetophenone	NS	***	***	***	***	***
2-Fluorobenzaldehyde	NS	NS	NS	***	***	***
2-Fluorobenzyl alcohol	NS	NS	***	***	***	***
3-Fluorobenzaldehyde	NS	*	***	***	***	***
2,6-Difluorobenzaldehyde	***	***	***	***	***	***
p-Tolualdehyde	NS	NS	***	***	***	***
4′-Fluoroacetophenone	NS	***	***	***	***	***
2′,4′-Difluoroacetophenone	***	***	***	***	***	***

Table 3. Statistics for the responses of SlitOR25 to known (acetophenone, benzyl alcohol and benzaldehyde) and new ligands at different doses. Solvent: ethanol. Asterisks indicate statistically significant differences between responses to the odorant and to solvent (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test, *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$, $n = 5$).

Modeling has already been shown to provide accurate information and facilitate the selection of active molecules on odorant receptors. In insects, it has been applied only in two Diptera models, the fruit fly and the mosquito[24,25,28]. In this study, we reveal that a conventional machine learning approach is efficient for the identification of novel agonists for a moth receptor, whose amino acid sequence is unrelated to that of Diptera ORs.

It has to be noticed that none of the novel agonists discovered here has been previously described in the literature to be active on moth ORs and most are not described as plant emitted volatiles. Although they may not be encountered by insects in the wild, we have anyhow extended the chemical space of *S. littoralis* and the cumulated results open up ligand structure-function relationship analyses. More importantly, closed-loop machine learning is now possible, where the new highly potent agonists discovered here could be used to train new models, further improving predictions in alternative and far removed chemical spaces.

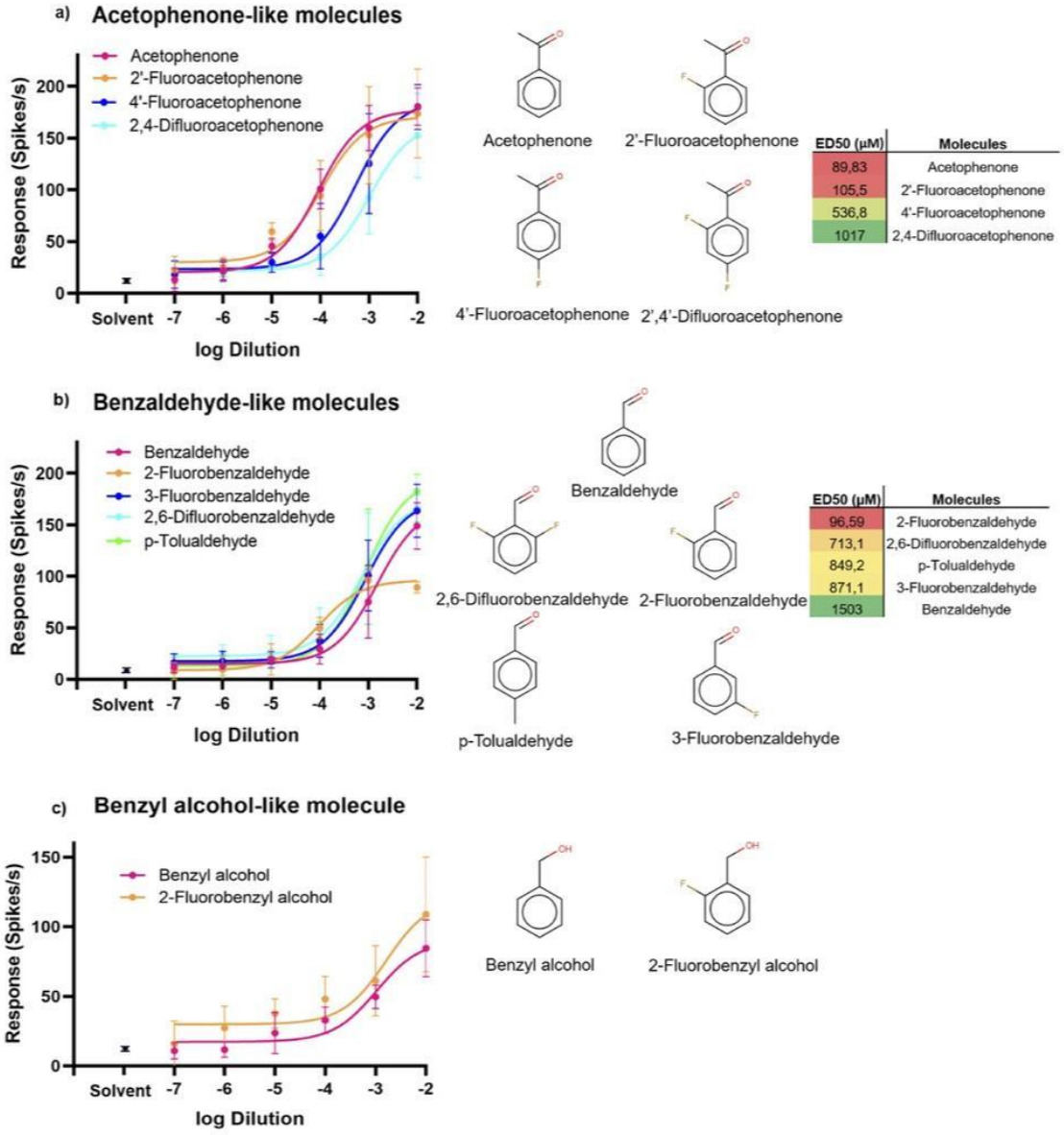


Figure 3. Dose-response activities (measured via SSR), structures and ED50 values of newly identified and three previously identified ligands on SlitOR25 expressed in *Drosophila* ab3A OSNs. SSR responses are presented ± s.e.m. Only molecules with a significant activity in the screening tests ($p < 0.05$, 10^{-2} dilution, Fig. 2) were tested in dose-response using dilutions from 10^{-7} to 10^{-2}. (**a**) Molecules structurally related to the known ligand acetophenone: 2′-fluoroacetophenone, 4′-fluoroacetophenone, 2′,4′-difluoroacetophenone. (**b**) Molecules related to the ligand benzaldehyde: 2-fluorobenzaldehyde, 3-fluorobenzaldehyde, 2,6-difluorobenzaldehyde, p-tolualdehyde. (**c**) Molecule related to the ligand benzyl alcohol: 2-fluorobenzyl alcohol.

Methods

Reagents. Reagents were purchased from various vendors (Table 2) at the highest available purity (ranging from 96 to 99% depending on the molecules) and were dissolved in ethanol (96% purity, Carlo Erba reagents).

Quantitative structure activity relationship. *Softwares.* Knime v3.2.1 was used to build the workflow, chemical descriptors were computed with Dragon v6.0.40 and the LibSVM v2.89 was used for the machine learning protocol[35].

Training and test sets. The initial database of 52 volatiles (Supplementary Table S1) was obtained from[18]. The previously identified strong agonists of SlitOR25 were benzenoids (acetophenone, benzyl alcohol, benzaldehyde, phenyl acetaldehyde, 1-indanone) and short aliphatic alcohols and aldehydes (1-hexanol, 1-heptanol, (Z)3-hexenol, (E)2-hexenal)[18], which are compounds emitted mainly by flowers and leaves[36]. The receptor also responds to four other molecules (methyl salicylate, methyl benzoate, benzyl methyl ether, (E)2-hexenol), with weaker but still significant responses. The SlitOR25 database thus contains 13 agonists and 39 non-agonists. It was randomly split into a training set of 42 molecules and a test set of 10 molecules. Molecules of the training set were considered for the optimization of the model. Those of the test set were not used to build the model but to assess its performance.

External test set. 3 306 388 molecules out of 90 million were extracted from the Pubchem database[37] according to the following physico-chemical properties obtained directly on the website: each molecule has to contain a combination of C, H, O, N, F, S, or Cl elements with less than 20 heavy atoms, a molecular weight lower than 200 $g.mol^{-1}$, and a LogP in the range [0, 5].

Chemical space analysis. The Database of Odorant Response (DoOR v2.0)[33] was used to analyze the *S. littoralis* chemical space that has been used to train the machine learning model. Excluding salts from the analysis, DoOR contains 680 odorants that have been experimentally tested on *D. melanogaster*. The t-SNE dimensionality reduction method was used to evaluate how our database of 52 ligands span a typical insect chemical space.

Molecular descriptors. For each dataset of the QSAR model (training, test and external sets) 4885 descriptors were computed using the *Dragon* software (version 6.0.40) based on 3D sdf files obtained directly from Pubchem. Constant or near-constant (variance lower than 0.005) descriptors were excluded from the database as well as descriptors with at least one missing value. Each descriptor of the final matrix was normalized using a min-max protocol (range [0,1]) before the split between training and test sets. Note that a normalization before or after the split did not affect the nature of the predicted agonists. Redundant descriptors were removed (absolute pair correlation greater than or equal to 0.95). The final SVM matrix contained 394 molecular descriptors. It was used for the t-SNE visualization of the database containing both the *S. littoralis* and *D. melanogaster* chemical spaces (see supplementary Fig. S3 for details on t-SNE). The descriptors were computed on a machine with an intel Xeon with 32 GB of memory.

Setting up the QSAR model. Various numerical models, such as Random Forest or Perceptron (data not shown), were tested prior optimizing the chosen supervised machine learning method, the Support Vector Machine (SVM). A brute force optimization was applied to assess the exhaustive parameter value combination. The C-SVC (C-Support Vector Classification) model with a linear kernel was finally used.

The C-SVC parameters were optimized in a two-step process. First a 5-fold-random split was performed with a cost ranging from 1 to 10 with a step of 1. Epsilon varied between 0.0001 and 0.1 with a step of 0.01. The model's accuracy remained identical for values in this range. Second, a more precise 5-fold-random split sampling was performed, with a cost between 0.5 and 1.5 using a step of 0.1, and epsilon between 0.001 and 0.01 with a step of 0.001. Again, the accuracy was identical to that obtained with default settings (accuracy 0.9 ± 0.09).

The optimized SVM parameters were accordingly set as follows: cost = 1.0, epsilon 0.001. The leave-one-out cross validation method was used. Each of the 13 agonists was given a score of 1 and the non-agonists were given a score of 0.

Applicability domain. A Tanimoto score that measures the similarity between compounds and varies between 0 and 1 (whereby a value closer to 1 indicates greater similarity) was calculated from Pubchem molecular fingerprints (881 Pubchem molecular descriptors obtained from the CDK module of Knime). The use of Pubchem fingerprints has already been shown to correctly capture biological activities[38]. Putative new odorants which had a Tanimoto index higher than 0.92 with respect to the Training set were considered belonging to the applicability domain. In our case, this corresponds to 90 molecules.

Single-sensillum recordings of *Drosophila* olfactory sensory neurons. Flies were reared on standard cornmeal-yeast-agar medium (25 °C, 12 h light: 12 h dark cycle). SlitOR25-expressing flies were obtained by crossing the line *w;Δhalo/CyO;UAS-SlitOr25*[18] with the line *w; Δhalo/CyO;Or22a-Gal4*[34]. Single-sensillum recordings were conducted as previously described[18]. Briefly, a 2- to 8-day-old fly was placed on a microscope glass slide under a constant 1.5 $L.min^{-1}$ flux of charcoal-filtered and humidified air delivered through a glass tube of a 7 mm diameter, and observed with a light microscope (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 100X magnification objective. Action potentials from ab3A OSNs were recorded using electrolytically sharpened tungsten electrodes (TW5-6, Science Products, Hofheim, Germany).

Stimulus cartridges were built by placing a 1 cm^2 filter paper in a Pasteur pipette and loading 10 µl of the odorant solution onto the paper (10^{-2} dilution in ethanol), or 10 µL of ethanol as control. Evaporation time before using the cartridge was 10 minutes. Odorant stimulations were performed by inserting the tip of the pipette into a hole in the glass tube and generating a 500 ms air pulse (0.6 $L.min^{-1}$). The responses of ab3A OSNs were calculated as in[39] by subtracting the spontaneous firing rate (in $spikes.s^{-1}$) from the firing rate during the odorant stimulation.

The absence of the endogenous receptor OR22a in ab3A OSNs was verified using ethyl hexanoate (a strong ligand of OR22a) as a stimulus. Then, the SlitOR25 response spectrum was established using the panel of 32 predicted agonists (Table 2) and four already known ligands as controls. The stimulus cartridges were used at most twice per fly (and maximum eight times in total). The entire panel of molecules was tested ten times on ten

different flies expressing SlitOR25. Odorants were considered as active if the response was statistically different from the response elicited by the solvent alone (Kruskal–Wallis test, followed by a Dunnett multiple comparison test, $p < 0.05$).

For molecules that yielded a statistically significant response, dose-response experiments were conducted with odorant dilutions ranging from 10^{-2} down to 10^{-7}. Each dilution was tested in five different flies expressing SlitOR25. ED50 were calculated (except for benzyl alcohol and 2-fluorobenzyl alcohol) using GraphPad PRISM V.8.1.2 software.

SlitOR25 pharmacophore hypothesis. For the generation of the SlitOR25 pharmacophore, we considered a dataset of eleven odorants that are active on SlitOR25, as well as fourteen inactive compounds. All these molecules are derivatives of acetophenone described in this work. The pharmacophore was generated with up to four features, chosen between H-bond donors/acceptors, hydrophobic sites, and aromatic rings. Even considering several conformations for each molecule, the pharmacophore hypotheses generated by the software CATALYST (version 4.9.1, Accelrys Inc., San Diego, CA, August 2004) were identical, comprised of an aromatic ring and a H-bond acceptor. The addition of exclusion volumes did not improve the model and was thus discarded.

Received: 2 August 2019; Accepted: 9 January 2020;
Published online: 03 February 2020

References

1. Kaupp, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188–200, https://doi.org/10.1038/nrn2789 (2010).
2. Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 373–391, https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635 (2013).
3. Buck, L. & Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175–187, https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-X (1991).
4. Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A. & Axel, R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* **96**, 725–736, https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80582-6 (1999).
5. Clyne, P. J. *et al.* A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in Drosophila. *Neuron* **22**, 327–338, https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81093-4 (1999).
6. Su, C. Y., Menuz, K. & Carlson, J. R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell* **139**, 45–59, https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015 (2009).
7. Mombaerts, P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Sci.* **286**, 707–711, https://doi.org/10.1126/science.286.5440.707 (1999).
8. Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W. & Vosshall, L. B. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.* **4**, e20, https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040020 (2006).
9. Larsson, M. C. *et al.* Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* **43**, 703–714, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.019 (2004).
10. Vosshall, L. B. & Hansson, B. S. A Unified Nomenclature System for the Insect Olfactory Coreceptor. *Chem. Senses* **36**, 497–498, https://doi.org/10.1093/chemse/bjr022 (2011).
11. Silbering, A. F. & Benton, R. Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: 'chance or design'? *EMBO Rep.* **11**, 173–179, https://doi.org/10.1038/embor.2010.8 (2010).
12. Peterlin, Z., Firestein, S. & Rogers, M. E. The state of the art of odorant receptor deorphanization: a report from the orphanage. *J. Gen. Physiol.* **143**, 527–542, https://doi.org/10.1085/jgp.201311151 (2014).
13. Montagné, N., de Fouchier, A., Newcomb, R. D. & Jacquin-Joly, E. Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **130**, 55–80, https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.11.003 (2015).
14. Silva Teixeira, C. S., Cerqueira, N. M. & Silva Ferreira, A. C. Unravelling the Olfactory Sense: From the Gene to Odor Perception. *Chem. Senses* **41**, 105–121, https://doi.org/10.1093/chemse/bjv075 (2016).
15. Wang, B., Liu, Y., He, K. & Wang, G. Comparison of research methods for functional characterization of insect olfactory receptors. *Sci. Rep.* **6**, 32806, https://doi.org/10.1038/srep32806 (2016).
16. Wang, G., Carey, A. F., Carlson, J. R. & Zwiebel, L. J. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 4418–4423, https://doi.org/10.1073/pnas.0913392107 (2010).
17. Carey, A. F., Wang, G., Su, C. Y., Zwiebel, L. J. & Carlson, J. R. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nat.* **464**, 66–71, https://doi.org/10.1038/nature08834 (2010).
18. de Fouchier, A. *et al.* Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nat. Commun.* **8**, 15709, https://doi.org/10.1038/ncomms15709 (2017).
19. Hallem, E. A. & Carlson, J. R. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* **125**, 143–160, https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.050 (2006).
20. Mathew, D. *et al.* Functional diversity among sensory receptors in a *Drosophila* olfactory circuit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, E2134–2143, https://doi.org/10.1073/pnas.1306976110 (2013).
21. Ray, A. Reception of odors and repellents in mosquitoes. *Curr. Opin. Neurobiol.* **34**, 158–164, https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.014 (2015).
22. Katritzky, A. R. *et al.* Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 7359–7364, https://doi.org/10.1073/pnas.0800571105 (2008).
23. Oliferenko, P. V. *et al.* Promising Aedes aegypti repellent chemotypes identified through integrated QSAR, virtual screening, synthesis, and bioassay. *PLoS ONE* **8**, e64547, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064547 (2013).
24. Tauxe, G. M., MacWilliam, D., Boyle, S. M., Guda, T. & Ray, A. Targeting a dual detector of skin and CO2 to modify mosquito host seeking. *Cell* **155**, 1365–1379, https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.013 (2013).
25. Boyle, S. M., McInally, S. & Ray, A. Expanding the olfactory code by in silico decoding of odor-receptor chemical space. *Elife* **2**, e01120, https://doi.org/10.7554/eLife.01120 (2013).
26. Bushdid, C., de March, C. A., Fiorucci, S., Matsunami, H. & Golebiowski, J. Agonists of G-Protein-Coupled Odorant Receptors Are Predicted from Chemical Features. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 2235–2240, https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b00633 (2018).
27. Mansouri, K. & Judson, R. S. *In Silico* Study of *In Vitro* GPCR Assays by QSAR Modeling. *Methods Mol. Biol.* **1425**, 361–381, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3609-0_16 (2016).
28. Kepchia, D. *et al.* Use of machine learning to identify novel, behaviorally active antagonists of the insect odorant receptor co-receptor (Orco) subunit. *Sci. Rep.* **9**, 4055, https://doi.org/10.1038/s41598-019-40640-4 (2019).
29. Salama, H. S., Dimetry, N. Z. & Salem, S. A. On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Ztg. für Angew. Entomologie* **67**, 261–266, https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1971.tb02122.x (1970).

30. Health), E. P. P. E. P. o. P. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Spodoptera littoralis*. *EFSA Journal* **13**, 3987, https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3987 (2015).
31. de Fouchier, A. *et al*. Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant Receptors. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 264, https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00264 (2018).
32. Butterwick, J. A. *et al*. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nat.* **560**, 447–452, https://doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8 (2018).
33. Munch, D. & Galizia, C. G. DoOR 2.0–Comprehensive Mapping of Drosophila melanogaster Odorant Responses. *Sci. Rep.* **6**, 21841, https://doi.org/10.1038/srep21841 (2016).
34. Dobritsa, A. A., van der Goes van Naters, W., Warr, C. G., Steinbrecht, R. A. & Carlson, J. R. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* **37**, 827–841, https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00094-1 (2003).
35. Chang, C.-C. & Lin, C.-J. LIBSVM: a library for support vector machines. *ACM Transactions on Intelligent Systems and Technology* **2**, article 27, https://doi.org/10.1145/1961189.1961199 (2011).
36. Knudsen, J. Y., Eriksson, R., Gershenzon, J. & Ståhl, B. Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot. Rev.* **72**, 1–120, https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFS]2.0.CO;2 (2006).
37. Kim, S. *et al*. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D1102–D1109, https://doi.org/10.1093/nar/gky1033 (2019).
38. Hao, M., Wang, Y. & Bryant, S. H. An efficient algorithm coupled with synthetic minority over-sampling technique to classify imbalanced PubChem BioAssay data. *Analytica Chim. acta* **806**, 117–127, https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.050 (2014).
39. de Fouchier, A. *et al*. Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus *Spodoptera*. *Front. Ecol. Evol.* **3**, 95, https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00095 (2015).

Acknowledgements

The authors thank Philippe Touton (iEES-Paris) for insect rearing and Xiaojing Cong (ICN, Nice) for help with the software PRISM V.8.1.2. This work has been funded by INRAE, Sorbonne Université and the French National Research Agency (ANR-16-CE21-0002). GC-V received doctoral fellowships from BECAL and the National Council of Science and Technology of Paraguay. C.B. has been granted by GIRACT for a PhD bursary. We also benefited from funding from the French government, through the UCAJEDI "Investments in the Future" project managed by the ANR grant No. ANR-15-IDEX-01.

Author contributions

E.J.-J., J.G., N.M. and S.F. conceived and designed the experiments. G.C.-V. and C.B. designed and performed the experiments and analyzed the data. H.G. perform experiments. E.J.-J., J.G., G.C.-V., C.B., N.M. and S.F. wrote and revised the paper. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-58564-9.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.M., J.G. or E.J.-J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

Chapitre 4 : Écologie chimique inverse chez un papillon de nuit : l'approche de machine learning appliquée aux récepteurs olfactifs permet l'identification de nouveaux agonistes actifs sur le comportement.

Introduction

L'écologie chimique comprend l'étude des langages chimiques, des signaux et des mécanismes contrôlant les interactions entre les êtres vivants, que ce soit la communication entre les individus de la même espèce ou entre les organismes et leur environnement (Eisner and Meinwald 1995). Les écologues chimistes essaient de comprendre ces interactions, en particulier les signaux qui génèrent des comportements stéréotypés, pour ainsi déchiffrer la pierre de Rosette de la communication chimique des insectes (Leal 2014). Un des buts est de réduire l'utilisation de pesticides contre les insectes ravageurs et d'atténuer l'impact des insectes vecteurs de maladies animales. Cependant, identifier des substances volatiles qui seront actives dans le comportement de l'insecte peut être un processus très long car seul un nombre limité de molécules peut être testé.

En revanche, s'il existe des informations sur l'activation de certains récepteurs par des sémiochimiques associés à un comportement chez l'insecte, une stratégie intéressante est de cibler ces récepteurs pour découvrir de nouvelles molécules actives sur ce comportement. Cette approche est connue sous le nom d' « écologie chimique inverse », un terme suggéré pour le criblage des protéines olfactives comme raccourci vers des sémiochimiques actifs (Leal 2017).

Dans les travaux présentés dans ce chapitre, nous avons utilisé l'écologie chimique inverse pour l'identification de sémiochimiques agonistes d'OR qui pourraient être potentiellement appliqués, en combinaison avec d'autres stratégies de lutte intégrée, contre les larves ravageuses des cultures de *Spodoptera littoralis*. Pour mener à bien ce projet nous avons combiné la modélisation de ligand *in silico*, démontrée comme étant efficace dans une première étude de preuve de concept réalisée au cours de cette thèse (détaillée dans le chapitre 3), la vérification expérimentale de l'activité des ligands prédits sur les OR, et l'étude de leurs effets comportementaux *in vivo*. Ici, nous avons poursuivi l'étude de criblage *in silico* sur le récepteur déjà ciblé dans la première étude (SlitOR25), et appliqué la même méthode à un autre OR (SlitOR24) dont le rôle est également très important dans la détection de volatils attractifs pour les chenilles (de Fouchier et al. 2018).

L'approche chimio-informatique ciblée sur ces deux récepteurs est similaire à celle détaillée dans le chapitre 3, et a consisté en des modèles QSARs permettant de prédire des nouvelles molécules à partir des caractéristiques communes des ligands connus. Ces modèles ont été développés chez nos collaborateurs de Chemosim (Nice), comme pour le modèle du chapitre 3, et

ces modèles ont pu être améliorés en utilisant les résultats précédents, c'est-à-dire en y injectant les ligands actifs nouvellement identifiés au chapitre 3. Une autre différence par rapport à la preuve de concept du chapitre 3 est que cette fois-ci, seules des molécules naturelles disponibles au laboratoire ont été explorées *in silico,* plutôt que la base de données PubChem. En effet il est important, dans l'optique de leur utilisation en biocontrôle, d'utiliser des odeurs non toxiques présentes naturellement dans l'environnement.

Dans un second temps, les molécules prédites par QSAR ont été testées sur les OR pour vérifier leur activité en électrophysiologie, en utilisant le système de « neurone vide » chez *Drosophila melanogaster* couplé à l'enregistrement monosensillaire (SSR ou Single Sensillum Recording) (Dobritsa et al. 2003). L'avantage de ce système est que l'OR candidat est ainsi exprimé dans le contexte d'un neurone olfactif, normalement sensible aux odorants.

Cette approche a permis, dans cette deuxième étude, d'améliorer le taux de prédiction de molécules actives pour SlitOR25, en allant de 28% dans l'étude précédente (chapitre 3) à 100% ici (Caballero-Vidal et al. 2020). Pour SlitOR24, les données fonctionnelles obtenues par de Fouchier et al. (2017) ont été utilisées pour alimenter le premier QSAR, et les tests électrophysiologiques ont démontré que 92% des molécules prédites étaient actives sur ce récepteur. Plusieurs molécules ont été prédites comme étant actives pour les deux récepteurs ciblés, ce qui a été vérifié dans les tests d'électrophysiologie.

Bien que plusieurs molécules aient été caractérisées comme actives sur les SlitOR étudiés, l'activation d'un OR n'est pas suffisante pour déduire une activité comportementale. La dernière étape pour vérifier l'efficacité de notre approche d'écologie chimique inverse a donc été d'étudier le comportement des chenilles vis-à-vis des nouveaux ligands identifiés pour SlitOR24 et 25, par la mise au point d'un dispositif nouveau au laboratoire, l'olfactomètre en Y pour petits insectes (ici chenilles). Cet olfactomètre possède un flux d'air constant, ce qui permet un contrôle de la dispersion des molécules odorantes. Le dispositif a été conçu et commandé à façon par Jérémy Gévar, IE au laboratoire, et nous avons validé ensemble son efficacité pour étudier le comportement larvaire.

Sept molécules prédites comme agonistes pour les deux récepteurs ciblés et étant actives en électrophysiologie ont été testées en comportement à deux dilutions différentes. Les résultats montrent que les chenilles étaient fortement attirées par les sept composés à forte concentration, et

pour la concentration plus faible l'effet attractif a été observé pour trois molécules sur sept, ce qui démontre que les molécules testées sont attractives d'une manière dose-dépendante.

Cette stratégie « ligand-ciblée » démontre qu'une approche intégrée peut permettre d'accélérer la découverte de molécules actives sur le comportement, car elle peut permettre une sélection parmi un large éventail de molécules qu'il serait bien trop long de tester une à une en comportement.

Reverse chemical ecology in a moth: machine learning on odorant receptors identifies new behaviorally active agonists

Gabriela Caballero-Vidal[1], Cédric Bouysset[2], Sébastien Fiorucci[2], Jéremy Gévar[1], Hayat Mbouzid[1], Céline Nara[1], Julie Delaroche[1], Jérôme Golebiowski[2,3,*], Nicolas Montagné[1,*] & Emmanuelle Jacquin-Joly[1,*]

[1] INRAE, Sorbonne Université, CNRS, IRD, UPEC, Université de Paris, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France

[2] Institute of Chemistry of Nice, UMR CNRS 7272, Université Côte d'Azur, Nice, France

[3] Department of Brain and Cognitive Sciences, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology, Daegu 711-873, South Korea

* Corresponding authors:

Emmanuelle Jacquin-Joly
INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Route de St-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.
emmanuelle.joly@inrae.fr
+33 1 30 83 32 12

Jérôme Golebiowski
Institute of Chemistry of Nice, UMR CNRS 7272, Université Côte d'Azur, 28 avenue Valrose 06108 Nice Cedex 2, Nice, France.
jerome.golebiowski@unice.fr

Nicolas Montagné
Sorbonne Université, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.
nicolas.montagne@sorbonne-universite.fr
+33 1 44 27 38 37

Abstract

Many insect behaviours depend on the detection of olfactory cues, which can eventually attract or repel them. The identification of behaviorally-active volatiles for a given insect is a fastidious process, which often requires to limit the amount of molecules tested during behavioral assays. However, when olfactory proteins or neuronal circuits linked to a particular behavior are known, it is possible to use them as targets in large-scale screenings designed for the identification of novel behaviorally-active volatiles. This process is called reverse chemical ecology. We applied such a strategy on larvae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*, a polyphagous crop pest in Africa, the Middle East and South of Europe. Building on a previous work that identified two odorant receptors (SlitOR24 and 25) whose activation is linked to caterpillar attraction, we used chemo-informatics to predict novel natural ligands for these receptors. *In silico* predictions proved to be highly efficient, as nearly 100% of the predicted agonists triggered a response in *Drosophila* olfactory neurons expressing SlitOR24 or SlitOR25. Some of the newly identified ligands even appeared as better agonists than those identified previously. When tested in Y-maze behavioral assays, the most active novel ligands on the two receptors proved to be attractive for fourth-instar caterpillars, as predicted initially. This work shows that reverse chemical ecology can be applied for the efficient identification of volatiles that are behaviorally-active towards a pest insect.

Introduction

Insects detect and use odorant information from the external environment to make important decisions, such as selecting a sexual partner, a food source or an oviposition site (Hansson and Stensmyr 2011, Gadenne et al. 2016). Depending on the species ecology, odorant signals can repel or attract insects. Among behaviorally relevant molecules, one can cite the moth sex pheromones that attract males miles away. Because of such olfactory-triggered behaviors, odorant molecules have been exploited to develop control strategies against insect pests and disease vector populations (Witzgall et al. 2010, Nyasembe and Torto 2014, Ray 2015) that are integrated in combination with other strategies in Integrated Pest Management. For instance, synthetic moth sex pheromones have been used for decades for population monitoring or mating disruption (Witzgall et al. 2010), aggregation pheromones and/or host plant volatiles are used for mass trapping, non-host or toxic odorants are used as repellents. However, such molecules are usually difficult to identify, because their identification mainly relies on bioassay-guided approaches, including fastidious behavioral trials on multiple individuals.

In this context, reverse chemical ecology has recently emerged as a powerful alternative to identify relevant signals for a given species. This approach proposes to screen olfactory proteins to identify putative behaviorally active semiochemicals (Choo et al. 2018). It has been promoted by the recent advances in our understanding of the molecular basis of insect olfaction in the last two decades, especially the discovery of odorant receptors (ORs) (Leal 2013). ORs are transmembrane proteins primarily responsible for odorant detection in insects. They are expressed in olfactory sensory neurons (OSNs) housed in olfactory sensilla, located mainly on the antennae. ORs form ion

channels together with a subunit called Orco (OR coreceptor) that is highly conserved across insects. Odorants activate the corresponding OR-Orco complex that transforms the chemical signal into an electrical signal that is transmitted to the brain, leading to the behavioral response. Reverse chemical ecology approaches can be applied on ORs involved in critical behaviors, such as attraction or repulsion. Identifying molecules that will be active on target ORs remains difficult (Ray 2015), but ligand-based *in silico* strategies relying on the chemical structures of active compounds have proven to be quite effective for *virtual screening* (VS) of ORs. Such chemo-informatics strategies have been applied with success to predict the activity of chemicals in model insects such as *Drosophila melanogaster* (Boyle et al. 2013) and the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Katritzky et al. 2008, Oliferenko et al. 2013, Tauxe et al. 2013, Zhang et al. 2013b, Kepchia et al. 2019). Quantitative-structure-activity relationship (QSAR) belongs to the virtual screening models that have been developed based on existing data (Tropsha and Golbraikh 2007). It allows to predict biological activity for untested chemicals and determine the physico-chemical properties based on the molecular features of various compounds. QSAR constitutes one of most used computational tools specially in medical chemistry, in the search of drugs (Cherkasov et al. 2014, Mansouri and Judson 2016) and recently in the search for OR ligands able to modify insect pest behaviors (Katritzky et al. 2008, Oliferenko et al. 2013, Zhang et al. 2013b). Potential ligands obtained by QSAR present a variable success rate. In one study performed in *Drosophila*, more than 240 000 compounds were first screen *in silico* aiming to find new ligands for ORs (Boyle et al. 2013). OR-optimized descriptors allowed to rank the untested and natural molecules, identifying the top 500 hits for each OR. Predicted compounds were experimentally tested on nine ORs, showing 71% of success rate compared to only 10% success rate while using non-predicted odors (Boyle et al. 2013). Several studies focusing on the search for mosquito repellents have used similar *in silico* approaches with variable success rates. Tauxe et al. (2013) obtained a ~30% success rate in a first round of prediction using molecular descriptors. In a second round they increased prediction accuracy through an SVM-based approach (Support Vector Machine), yielding an improved success rate of 74%.

In a recent study, we used QSAR model to predict active ligands for an OR in a non model insect species, the crop pest moth *Spodoptera littoralis*, revealing it is possible to use machine learning to predict OR-active chemicals outside Diptera (Caballero-Vidal et al. 2020). In this former study, we targeted SlitOR25, an OR whose activation has been proven to be linked to larvae attraction behavior (de Fouchier et al. 2018). Predictions coupled to experimental validations revealed enrichment of receptor agonists, with a hit rate of 28% (Caballero-Vidal et al. 2020). This study greatly contributed to extend the odor space for this crop pest insect, providing information about unexpected ligands.

In the present study, we used the results of this first round of modeling to complement the dataset of known ligands and enrich the QSAR model for a second round of prediction, which surprisingly led to a success rate of 100% active molecules on the target receptor. Since olfactory-driven attraction in *S. littoralis* larvae has been shown to rely not only on SlitOR25 but also on SlitOR24 activation (de Fouchier et al. 2018), this latter OR was also investigated using a similar approach. With the final aim at identifying new attractive semiochemicals for *S. littoralis* larvae, we conducted behavioral experiments to investigate the activity of some of the new SlitOR24 and 25 agonists. This work, combining chemo-informatics, electrophysiological analyses and

behavioral assays, not only expand the list of natural SlitOR ligands but also successfully identify new larval attractants that can potentially be implemented in biocontrol strategies.

Materials and methods

Insects

S. littoralis larvae were reared on a semi-artificial diet (Poitout and Bues 1974) under the following conditions: 22 °C, 60% relative humidity and 16:8-h light: dark cycle. Fourth-instar larvae (L4) were used for behavioral assays.

Transgenic *D. melanogaster* flies expressing SlitOR24 and 25 were obtained by crossing the lines w;Δhalo/CyO;UAS-SlitOR24 and w;Δhalo/CyO;UAS-SlitOR25 (de Fouchier et al. 2017) with the line w;Δhalo/CyO;OR22a-Gal4 (Dobritsa et al. 2003). Flies were reared on standard nutrient medium made of cornmeal, yeast and agar. Flies were kept at 25 °C, and 12:12-h light: dark cycle.

Modeling

Datasets

The SlitOR25 QSAR model was built using the initial dataset of 51 experimentally tested molecules (de Fouchier et al. 2017) enriched with the 32 molecules experimentally tested in (Caballero-Vidal et al. 2020), resulting in a dataset of 83 molecules labelled as active (22 molecules) or inactive (61 molecules) against SlitOR25. For the SlitOR24 QSAR, the dataset of 51 molecules (9 actives, 42 inactives) was obtained from de Fouchier et al. (2017). An in-house library of 165 compounds extracted from plants was screened by both numerical models. Each molecule was collected as SMILES strings, the major tautomer at pH 7.0 was retrieved with cxcalc (Calculator Plugins, Marvin 18.3.0, 2018, ChemAxon), and the resulting molecule was standardized with the standardizer python package v0.1.7 (for salt removal and structure normalization).Molecular descriptors were computed directly from the standardized SMILES using Dragon v6.0.38. Feature exclusion was performed within the software based on the following criteria: constant or near-constant descriptors, descriptors with at least one missing value, highly correlated descriptors (absolute pair correlation greater than or equal to 0.95 for SlitOR25 and 0.9 for SlitOR24) were excluded. This resulted in libraries of 493 descriptors for SlitOR25 and 288 for SlitOR24.

The SlitOR24 and SlitOR25 datasets (supp. data 1 (excel)) were split in training and test sets using a common clustering method, the sphere-exclusion approach, which can select a diverse subset of compounds in a dataset. For both sets, descriptors were normalized between 0 and 1, and the split was initialized by putting in the test set the compound closest to the center of the normalized dataset. At each iteration the new compound to be added to the test set was selected using a MinMax procedure, the dissimilarity radius to exclude compounds from the test set was set to 4.0 for SlitOR25 and 4.8 for SlitOR24, and the algorithm was stopped once the test set reached 24% of the size of the original dataset. This resulted in training sets of 64 molecules (18 actives, 46 inactives) and 39 molecules (8 actives, 31 inactives), and test sets of 20 molecules (7 actives, 13 inactives) and 12 molecules (2 actives, 10 inactives) for SlitOR25 and SlitOR24, respectively. For

both datasets, each descriptor was then denormalized and normalized only based on the training set min and max values.

Machine-Learning

QSAR models were trained and evaluated using Weka v3.8.2 (Witten et al. 2016). Several classification algorithms were optimized in "leave-one-out" (LOO) cross-validation loops: C-SVC (LibSVM v1.0.10), k-nearest neighbors (kNN), RandomTree DecisionTree, and RandomForest. Cost-sensitive models were also tested without providing a significant improvement in performance. Once the optimal algorithm and hyperparameters were identified, the final models were trained on the full training set and parametrized as follow: for SlitOR24 a RandomForest was trained with 100 trees, unlimited maximum depth for each tree, and no feature randomly chosen, for SlitOR25 a kNN classifier (IBk) was chosen with 9 neighbors, weighted by the inverse of the Euclidean distance, and a brute force neighbor search. Finally, the performances of the SlitOR24 and SlitOR25 models were assessed on the test sets.

Applicability Domain

A distance cutoff approach (Tropsha et al. 2003)) was used to estimate the applicability domain of both models. The distance cutoff is defined as $Dc = \langle D \rangle + Z\sigma$ where $\langle D \rangle$ and σ are the mean and standard deviation of Euclidean distances of each training set compound with their nearest neighbor in the descriptor space, and Z is an empirical parameter. The parameter Z was incremented until all training set compounds had their distance with their kNN lower or equal to Dc. For SlitOR25, we kept the same number of neighbors as in the model (k=9) and for SlitOR24, we used k=3 based on our benchmark of different learners during the training phase. For each external compound, its distance with the kNN was measured and a reliability score was estimated as $reliability = 1 + \frac{D-Dc}{Dc}$.

Single sensillum recording on SlitOR24 and SlitOR25

Single sensillum recordings were performed on *Drosophila* lines expressing SlitOR24 or SlitOR25 in their ab3A neurons. A 2 to 8-day-old fly was immobilized in a pipette tip, only the head sticking out. The fly was placed on a microscope glass slide under a constant 1.5 L.min^{-1} flux of charcoal-filtered and humidified air delivered through a glass tube of a 7 mm diameter. The experiments were monitored using a light microscope (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 100X magnification objective. Action potentials from ab3A OSNs were recorded using electrolytically sharpened tungsten electrodes (TW5-6, Science Products, Hofheim, Germany). One reference electrode was inserted into the eye and the recording electrode was inserted at the base of ab3 sensilla using a motor-controlled PatchStar micromanipulator (Scientifica, Uckfield, United Kingdom). Odorants were purchased from Sigma-Aldrich. Stimulus cartridges were built by placing a 1 cm² filter paper in a Pasteur pipette and loading 10 µl of the odorant solution onto the paper (10^{-2} dilution in paraffin oil), or 10 µL of paraffin oil or a paper without any odorant as controls. Odorant stimulations were performed by inserting the tip of the pipette into a hole in the glass tube and generating a 500 ms air pulse (0.6 L.min^{-1}). The responses of ab3A OSNs were

calculated by subtracting the spontaneous firing rate (in spikes. s^{-1}) from the firing rate during the odorant stimulation.
The SlitOR25 response spectrum was established using a panel of 23 predicted agonists and 5 molecules predicted as non-agonists. For SlitOR24, the panel consisted of 14 molecules predicted as agonists plus the 23 SlitOR25 predicted agonists (that also presented a high score of activation prediction for SlitOR24). Each stimulus cartridge was used at maximum eight times in total. The cited panel of molecules was tested on six to ten different flies expressing SlitOR25 and SlitOR24. Odorants were considered as active if the response was statistically different from the response elicited by the solvent alone (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test, $p<0.05$).

Larvae behavior in Y-tube olfactometer

Behavioral experiments were done using a Y-tube olfactometer. The olfactometer consisted of a 2.1 cm inner diameter glass Y-tube, the main segment was 13 cm long, and each of the two arms was 9.5 cm long. L4 larvae were used and starved overnight (16 to 20 hours starvation) prior the experiments. Previous experiments have shown that this starvation period have no impact in larval survival or mobility, and that starved larvae are more motivated to orientate toward odor sources than satiated larvae (Poivet et al. 2012). All experiments were performed under red light, to avoid biases due to visual cues. Charcoal-purified air was delivered into each arm of the olfactometer at flow rates of 0.5 L.min-1 stabilized using a flowmeter (Key Instruments, Trevose, PA, USA) to ensure equal air streams entering each arm. The temperature of the room was maintained at 24°C during all tests. The experimental set-up was first tested with a positive control odorant, benzyl alcohol, known to induce larvae attraction (de Fouchier et al. 2018). Odorants were diluted in paraffin oil (dilutions 10^{-2} and 10^{-3}). Ten µl of diluted odorants or control (paraffin oil) were loaded on a filter paper. A paper with solvent was placed in one arm and a filter paper with the odorant dilution in the other arm. One larva at a time was placed in the main arm of the olfactometer and the behavior was recorded during 10 minutes with a digital camera located above the device. Each larva was tested only once. To avoid any bias during the test, the olfactometer was switched from one side to the other between each test and up to three times, before washing the olfactometer with TFD4 detergent diluted at 3% for 30 minutes, then rinsing with distilled water and 95% ethanol. Once dry, all glass parts were put in an oven at 200°C overnight. We analyzed two different parameters: 1) the choice made by the caterpillar and 2) the time spent in each arm. We considered that the caterpillar made a choice when three quarters of his body length entered an arm. Larvae that did not make a choice within ten minutes were not included in the statistical analysis. This explains the variable numbers of replicates for each test, ranging from 27 to 34. All behavioral assays were carried out within a 4 h time interval during larvae photophase.

Results

Virtual screening of SlitOR24 and 25

Models performance

Each SlitOR model was parameterized with a LOO strategy, re-trained on the full training set once the best parameters were identified, and validated using the independent test set (Table 1). For SlitOR24, due to the limited number of active molecules, the model seemed to be mostly tuned to classify correctly the non-agonists. For SlitOR25, the decrease in performance compared to our previous model (Caballero-Vidal et al. 2020) can be linked to the increased diversity in the chemical space, mostly due to the addition of fluorinated compounds. As stated in (Caballero-Vidal et al. 2020), there was no clear-cut explanation to the effect on the activity of the position of fluorine atom(s) on the aromatic ring. Thus, we hypothesize that the drop in modeling performance is mainly due to the increased complexity of the problem. However, this new model also came with the benefit of an expended applicability domain. Overall, both models had great predictive abilities (MCC $\geq$ 0.4, ROCAU $\geq$ 0.8) and were suitable to prioritize compounds for experimental testing.

	Dataset	TP	TN	FP	FN	%CC	Precision	Recall	MCC	AUROC
SlitOR24	LOO	4	29	2	4	84.6	0.67	0.50	0.49	0.83
	Training	7	31	0	1	97.4	1.00	0.88	0.92	0.99
	Test	1	9	1	1	83.3	0.50	0.50	0.40	0.80
SlitOR25	LOO	15	34	12	3	76.6	0.56	0.83	0.52	0.84
	Training	18	46	0	0	100	1.00	1.00	1.00	1.00
	Test	5	10	3	2	75	0.63	0.71	0.47	0.82

Table 1: Performance evaluation of the SlitOR24 and SlitOR25 QSAR models using different metrics. LOO: performance of the best model using a leave-one-out cross-validation strategy, TP: true positives, TN: true negatives, FP: false positives, FN: false negatives, %CC: percentage of correctly classified molecules, MCC: Matthews correlation coefficient, AUROC: area under the receiver operating characteristics curve.

Both models were used to virtually screen an in-house library of 165 natural volatile organic compounds. 28 and 67 molecules were predicted as agonists and within the applicability domain of SlitOR24 and SlitOR25 models, respectively, with 27 molecules in common. The 67 molecules predicted as agonists for SlitOR25 were re-screened by our previously published model (Caballero-Vidal et al. 2020) and 20 of them were predicted as agonists by both SlitOR25 models. These 20

compounds were considered in priority for the electrophysiological experiments on SlitOR25. In the end, 20 predicted agonists were experimentally tested on SlitOR25, as well as 4 predicted non-agonists.

Electrophysiological responses of SlitOR24 and SlitOR25 to the predicted agonists and non-agonists

Predicted agonists and non-agonists were experimentally tested for activity on the respective SlitORs expressed in *Drosophila* ab3A neurons using single-sensillum recording. Impressively, all predicted SlitOR25 agonists were active on this OR, with variable firing rates, leading to a 100% hit rate. Figure 1. presents the detailed response spectra of ab3A neurons expressing SlitOR25, stimulated with 20 predicted and commercially available molecules plus acetophenone, a compound already known as active on SlitOR25 and used as a positive control (de Fouchier et al. 2017). As expected, we observed a strong response for this control molecule. Two molecules from the panel exhibited responses above 100 spikes/s, nine presented responses between 40 and 60 spikes/s, and nine molecules between 20 and 40 spikes/s. Four molecules predicted as non-agonists for SlitOR25 were also tested to verify QSAR prediction capacities. None of them induced an electrical response in fly neurons expressing SlitOR25 (Figure 2).

Another receptor, SlitOR24, whose activation has previously been correlated with caterpillars attraction (as well as SlitOR25) (de Fouchier et al. 2018), has also been included in this study. Twenty seven molecules were predicted as active for SlitOR24, from which only one molecule was predicted exclusively for this receptor, all others were predicted for both SlitOR24 and SlitOR25. From these 27 molecules 25 were active on SlitOR24 leading to a hit rate of 92% of success rate (Figure 3). Since a previous study revealed that SlitOR24 and SlitOR25 have quite similar response profiles (de Fouchier et al. 2017), seven molecules predicted for SlitOR25 but not for SlitOR24 were also tested on SlitOR24. Surprisingly, more than 50% of the SlitOR25 predicted molecules were also active on SlitOR24, although at different response levels.

Behavioral effect of newly identified agonists

First, the setup was validated using benzyl alcohol, a volatile known to induce larvae attraction in a Petri dish assay (de Fouchier et al. 2018). Accordingly, larvae were statistically more attracted to the arm containing this volatile (whatever the dilution) than to the control arm. Then, the seven molecules that elicited the highest neuronal responses in flies expressing SlitOR24 and SlitOR25 [(Z)-2-hexenol, (E)-3-hexenol, 2-phenyl ethanol, benzyl cyanide, 2-heptanol, anisole and 2-hexanone] were used in the same behavioral assay. Two different dilutions were used. Results showed that for the 10^{-2} dilution, all molecules tested were attractive to the larvae (Figure 4). At dilution 10^{-3}, larvae did not show preference any more for four compounds: benzyl cyanide, 2-heptanol, anisole and 2-hexanone. Regarding the time spent in each arm (Figure 5), at the dilution 10^{-2}, larvae spent significantly more time in the arm containing five out of seven molecules tested: benzyl cyanide, (Z)-2-hexenol, 2-phenyl ethanol, anisole and 2-hexanone. At dilution at 10^{-3} the larvae spent more time in the arm containing three molecules: (E)-3-hexenol, 2-phenyl ethanol and 2-hexanone. Strikingly, the time spent by larvae on the arm containing (E)- 3-hexenol was higher at the lowest dilution.

Discussion

Reverse chemical ecology has recently appeared as a promising approach to identify new ligands for insect ORs and behaviorally active semiochemicals to be used for pest control. It has been mainly applied to mosquitoes, in view of identifying new disease vector repellents (Tauxe et al. 2013, Choo et al. 2018, Kepchia et al. 2019). Recently, we have published a proof-of-concept that revealed that such an approach can be extended to crop pests (Caballero-Vidal et al. 2020). Focusing on a single *S. littoralis* OR, SlitOR25, we could predict new agonists via machine learning that indeed were active on this OR. However, we did not investigate their behavioral activity. Anyhow, the chemical structures of the newly identified SlitOR25 agonists precluded their use for pest control, as most agonists were fluorinated compounds and can not be used in the fields.

In the present work, the objective was threefold. The first one was to improve our machine learning model for the prediction of agonists, since the first model revealed only 28% success rate in identifying active agonists (Caballero-Vidal et al. 2020). The second objective was to predict natural, plant derivative, non toxic and affordable agonists that would be compatible with pest control. The last objective was to investigate the behavioral activity of predicted agonists. To reach these objectives, we focused on SlitOR25, which has been used for establishing the machine learning proof-of-concept (Caballero-Vidal et al. 2020), and on another receptor, SlitOR24. These two ORs appeared as relevant targets for a reverse chemical ecology strategy, because their activation has been linked to larvae attraction (de Fouchier et al. 2018) and because they have close response spectra (de Fouchier et al. 2017).

First, we revealed that the QSAR models have been impressively improved, since we could obtain nearly one hundred percent of success rate (number of experimentally active ligands/number of predicted ligands) for both target receptors. Such high rates have not yet been obtained in previous studies focusing on Diptera models.

To reach the second objective, the QSARs have been used here to screen a small in-house virtual library of plant compounds, whereas Caballero-Vidal et al. (2020) screened a large subset of the Pubchem database selected on physico-chemical properties that led to the identification of structurally related, mainly fluorinated, predicted ligands.

Through this approach, we have identified new agonists for SlitOR24 and SlitOR25, greatly extending their initially described response spectra (de Fouchier et al. 2017). Both ORs presented a large overlapping receptive range, including alcohols, aromatic compounds and green leaf volatiles (GLVs). Interestingly, some (57 %) of the predicted ligands for SlitOR25 were also active on SlitOR24. This suggests that the binding pocket of both ORs would be quite similar and opens up further studies on structure-function relationship. In addition, since SlitOR24 and 25 have overlapping functions, elucidation of their expression patterns would reveal if they are expressed in the same or in different sensilla.

The behavioral effects of the new ligands that elicited high neuronal responses were investigated on larvae, and all proved to be attractants. These data confirmed the former hypothesis that SlitOR24 and OR25 activation is linked to larval attraction (de Fouchier et al. 2018).

Interestingly, many of these new attractants for *S. littoralis* larvae have never been reported to be relevant cues for adults and larvae on this species. From an ecologically point of view, what would

be the significance of these new ligands for *S. littoralis* larvae? Among the new ligands for SlitOR25, benzyl cyanide (a nitrogenous compound) induced the highest OSN firing rate and a high attraction rate. It has been shown previously that benzyl cyanide is a minor constituent of several plant headspaces, like the black poplar *Populus nigra* or Brussels sprouts *Brassicae oleracea* (Smid et al. 2002, McCormick et al. 2014). Benzyl cyanide is also naturally emitted by insects. It is an anti-aphrodisiac secreted by *Pieris brassicae* males and transferred to the females while mating, making them less attractive to conspecific males. It is an attractive compound to parasitoids wasps such as *Trichogramma* spp. (Fatouros et al. 2005, Huigens et al. 2009) and it elicits the strongest electrophysiological response in the antennae of the parasitoid *Glyptapanteles liparidis* (Clavijo Mccormick et al. 2014). For the desert locust *Schistocerca gregaria*, benzyl cyanide has a role in sexual behavior (Seidelmann et al. 2000).

Another interesting larval attractant is 2-phenylethanol, an aromatic compound commonly found in flowers that induced the highest firing rate in OSNs expressing SlitOR24. This compound was also the most attractive compound in behavioral assays for the larvae at both doses tested. It was documented as one of the most attractive compounds - together with phenylacetaldehyde - for *Helicoverpa armigera* adults (Gregg et al. 2010) and elicited high neuronal responses in *Heliothis virescens* females (Rostelien et al. 2005). Anderson et al. (2009) have reported that 2-phenylethanol served as an oviposition cue for *Bombyx mori* and other moth species. Saveer et al. (2012) showed that unmated *S. littoralis* females are strongly attracted to flowers volatiles, which represent food sources. The high attraction we have observed in *S. littoralis* larvae to a flower compound may be related to foraging behavior that may not only rely on GLV detection.

It is yet difficult to assess the ecological significance of the new larvae attractants we discovered here combining *in silico*, *in situ* and *in vivo* studies. Also, we did not investigated here the behavioral effects on adults, which are known to express SlitOR24 and 25 in their antennae. Anyhow, our work shows that reverse chemical ecology can be applied efficiently to identify behaviorally-active volatiles that could ultimately implement semiochemical-based control strategies against agricultural pests.

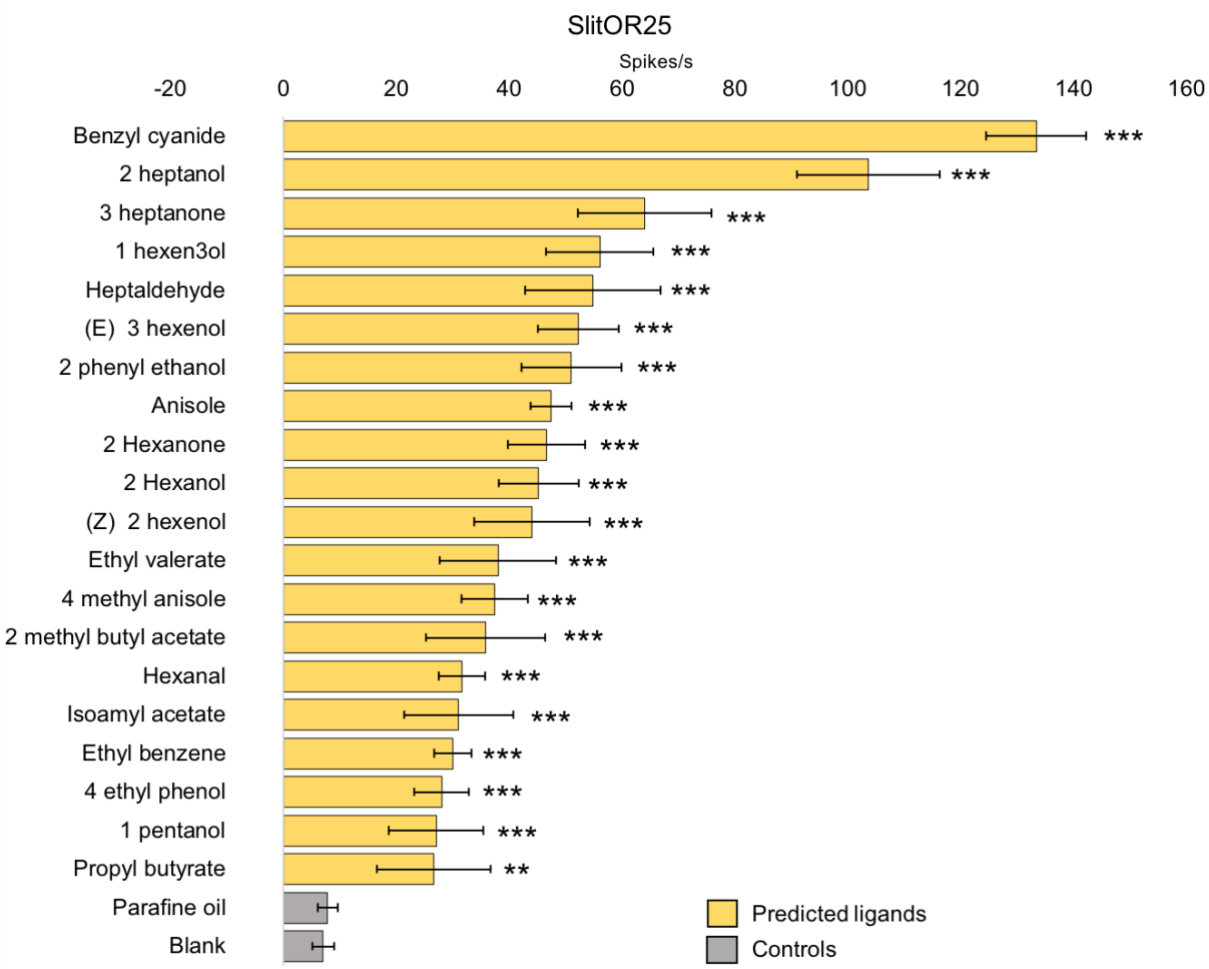


Figure 1. Single-sensillum recording (SSR) responses (spikes.s^{-1}) of *Drosophila* ab3A neurons expressing SlitOR25 during odorant stimulation. Yellow bars represent responses to all *in silico* predicted ligands for SlitOR25. Grey bars represent negative controls (solvent and filter paper without odorant). All molecules were tested at 10^{-2} dilution in paraffin oil. Asterisks indicate statistically significant differences between responses to the odorant and to the solvent (Kruskal–Wallis test followed by a Dunnett multiple comparison test, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, n=10).

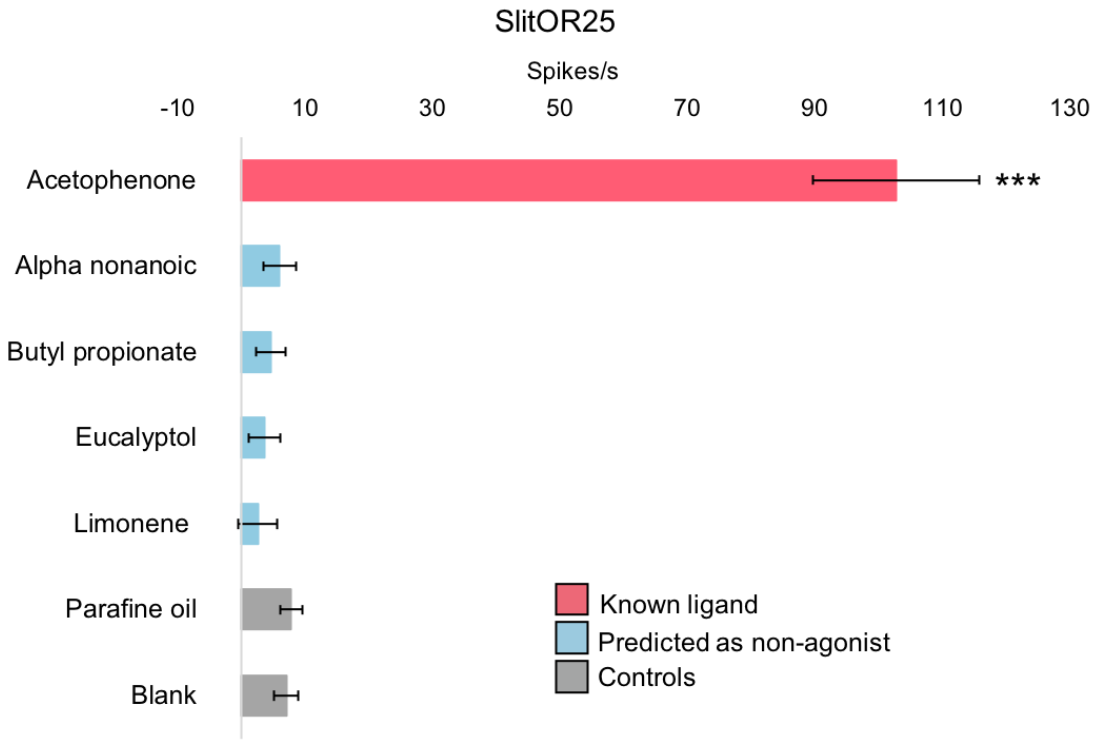


Figure 2. SlitOR25 responses to non-agonist predicted molecules. The pink bar represents the known ligand used as a positive control. Blue bars represent *in silico* predicted non-active molecules. Grey bars represent negative controls (solvent and filter paper without odorant). (*** $p<0.001$, Kruskal–Wallis followed by a Dunnett test, n=5).

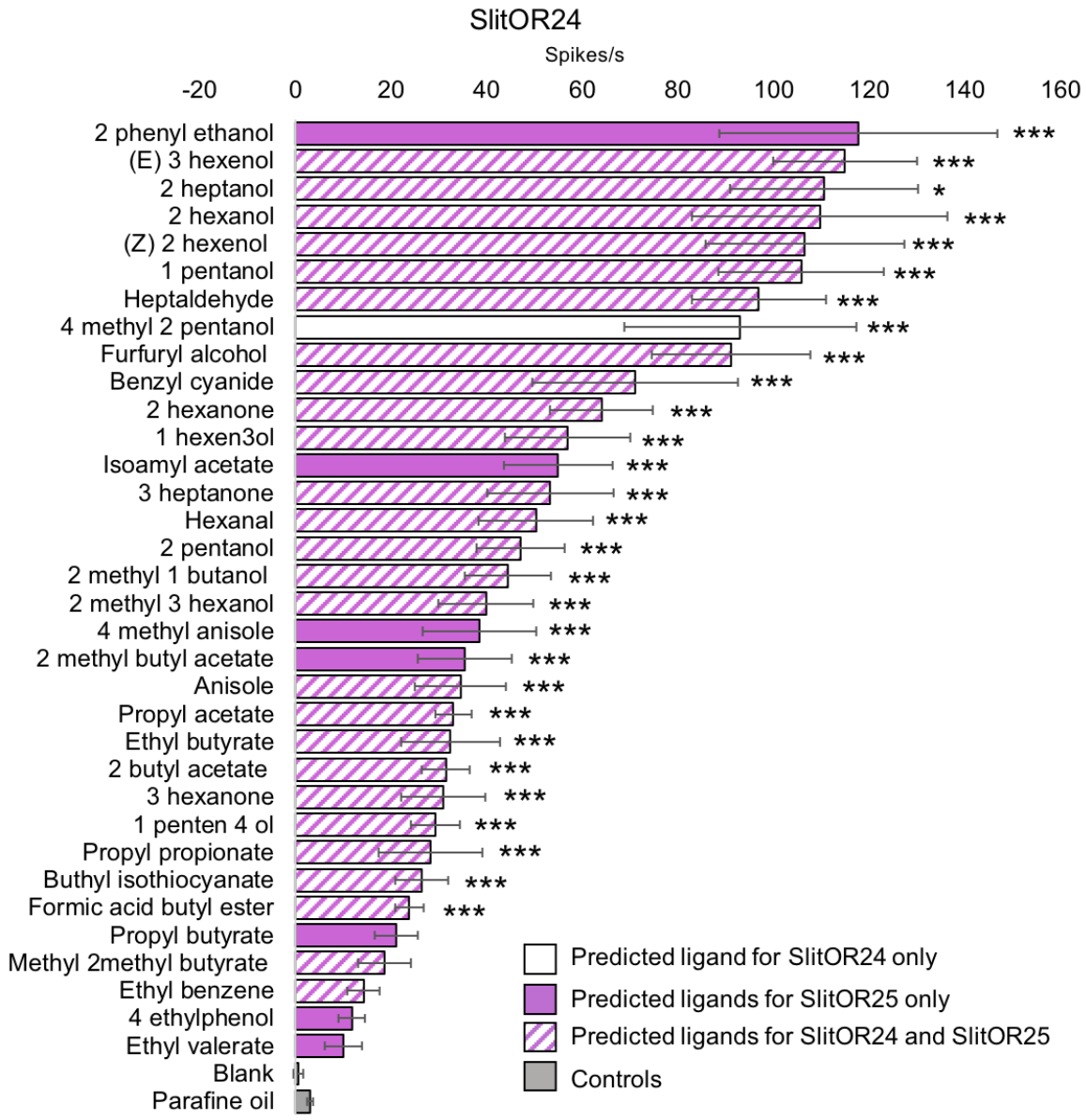


Figure 3. SSR responses (spikes.s^{-1}) of *Drosophila* OSNs expressing SlitOR24. The white bar represents the predicted agonists for SlitOR24 only. Purple bars represent the predicted agonists for SlitOR25. Purple striped bars represent predicted agonists for both SlitOR24 and SlitOR25. Grey bars represent negative controls (solvent and filter paper without odorant). All molecules were tested at 10^{-2}, paraffine oil dilution. Asterisks indicate statistically significant differences between responses to the odorant and to the solvent (Kruskal–Wallis followed by a Dunnett test, * $p<0.05$, *** $p<0.001$, n= 6-10).

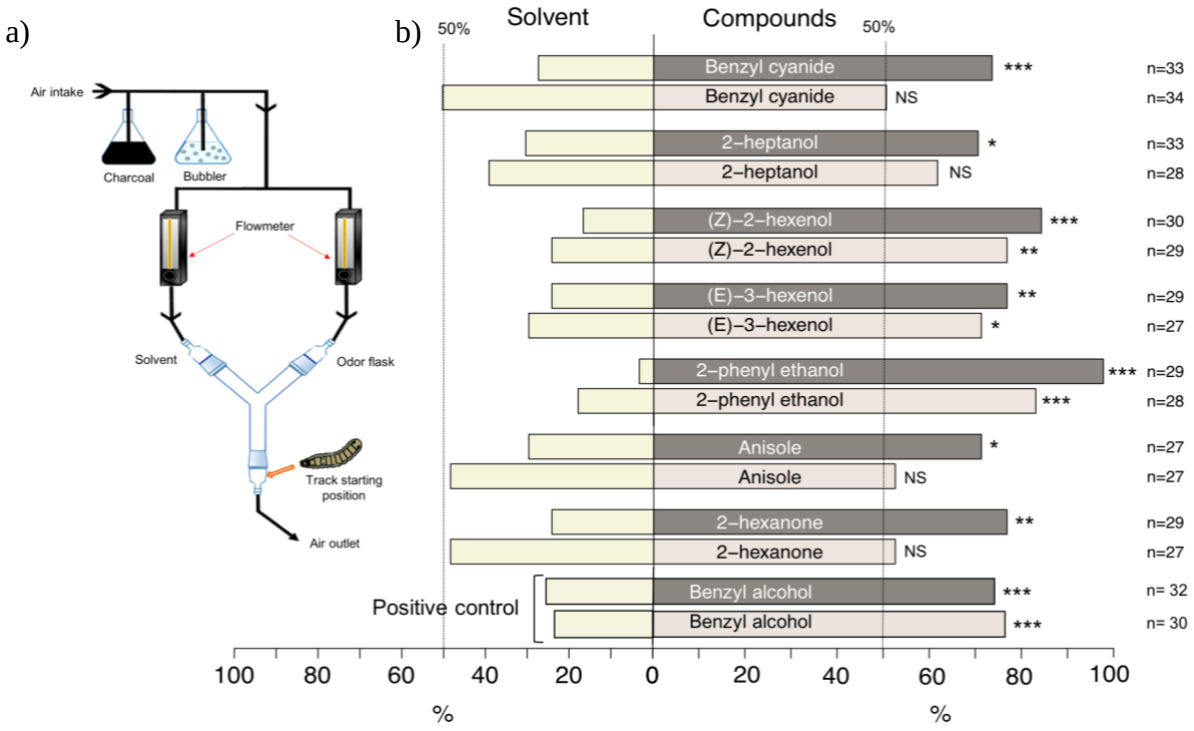


Figure 4. Experimental setup and percentage of larval choice in behavioral assays. a) Behavioral setup used to study caterpillar's odorant preference and the time spent in each arm. In this device, there is an air inlet, which circulates through two filters (active carbon and water bubbles), from where it passes to two flowmeters, to finally reach the Y-tube olfactometer. On one side of the olfactometer is the control (filter paper with paraffin oil) and on the other is the odorant dilution. At the base of the olfactometer, the air outlet and the starting point for the larva are indicated. b) Percentage of caterpillar choice: solvent on the left, molecules tested on the right. Gray bars represent the caterpillar's choice at 10^{-2} dilution, and light peach bars represent caterpillar's choice at 10^{-3} dilution. Chi-squared test for given probabilities was used to verified significant caterpillars' preferences. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, NS: not significant. Numbers of replicates (n) are indicated on the right of each bar.

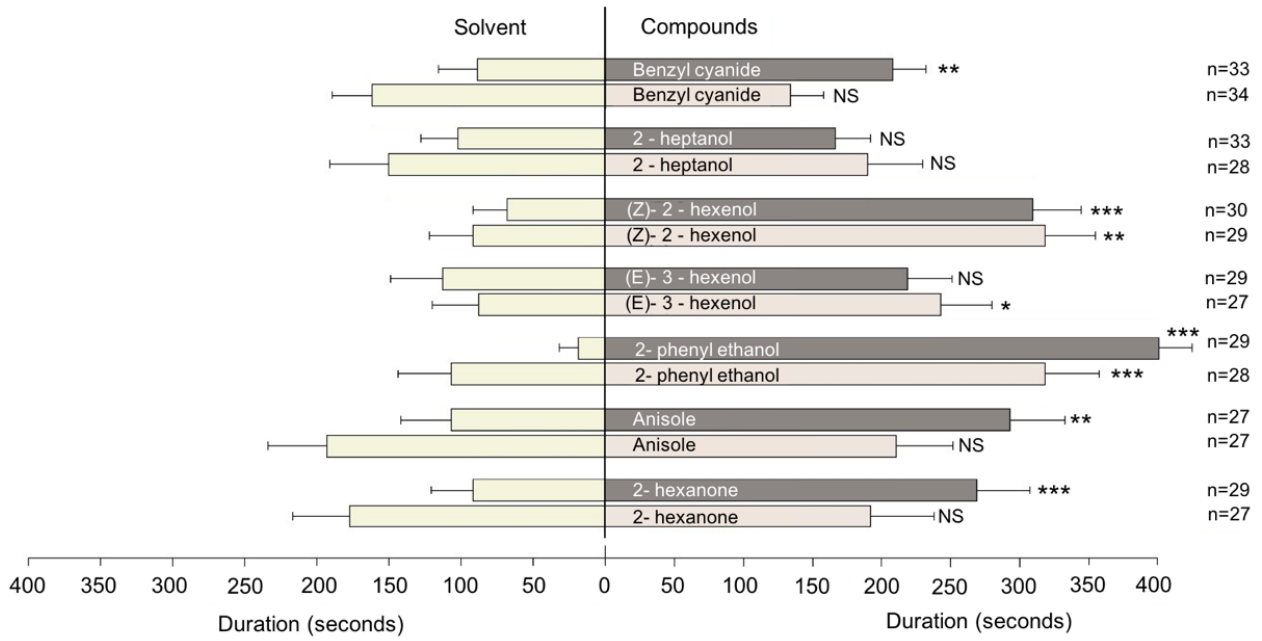


Figure 5. Time (in seconds) spent by the larvae in each arm on the Y-tube olfactometer. Bars at left represent the time spent in arm containing the solvent (paraffin oil). Bars at right: Gray bars represent the time spent in the arm containing the odorant at 10^{-2} dilution, and light peach bars represent the time spent in the arm containing the odorant at 10^{-3} dilution. Paired Student t test was used to compared the time each larva spent in each arm. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, NS: not significant. Numbers of replicates are indicated on the right of each bar.

Acknowledgements
We thank Pascal Roskam and Philippe Touton for insect rearing. This work has been funded by INRAE, Sorbonne Université and the French National Research Agency (ANR-16-CE21-0002). We thank BECAL and the National Council of Science and Technology of Paraguay for the doctoral fellowships awarded to G.C-V.

Author Contributions
E.J.-J., J.G., G.C.-V. N.M. and S.F. conceived and designed the experiments. G.C.-V. and C.B. designed and performed the experiments and analyzed the data. H.M, C.N., J.D. perform experiments. E.J.-J., J.G., G.C.-V., C.B., N.M. and S.F. wrote and revised the paper.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

References

Anderson, A. R., K. W. Wanner, S. C. Trowell, C. G. Warr, E. Jaquin-Joly, P. Zagatti, H. Robertson, and R. D. Newcomb. 2009. Molecular basis of female-specific odorant responses in Bombyx mori. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39:189–197.

Boyle, S. M., S. Mcinally, and A. Ray. 2013. Expanding the olfactory code by in silico decoding of odor-receptor chemical space:1–17.

Caballero-Vidal, G., C. Bouysset, H. Grunig, S. Fiorucci, N. Montagné, J. Golebiowski, and E. Jacquin-Joly. 2020. Machine learning decodes chemical features to identify novel agonists of a moth odorant receptor. Scientific Reports 10:1655.

Cherkasov, A., E. N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I. I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y. C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V. E. Kuz'Min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloth, J. Gasteiger, A. Richard, and A. Tropsha. 2014. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? Journal of Medicinal Chemistry 57:4977–5010.

Choo, Y.-M., P. Xu, J. K. Hwang, F. Zeng, K. Tan, G. Bhagavathy, K. R. Chauhan, and W. S. Leal. 2018. Reverse chemical ecology approach for the identification of an oviposition attractant for *Culex quinquefasciatus*. Proceedings of the National Academy of Sciences:201718284.

Clavijo Mccormick, A., J. Gershenzon, and S. B. Unsicker. 2014. Little peaks with big effects: Establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. Plant, Cell and Environment 37:1836–1844.

Di, C., C. Ning, L. Huang, and C. Wang. 2017. Design of larval chemical attractants based on odorant response spectra of odorant receptors in the cotton bollworm. Insect Biochemistry and Molecular Biology 84:48–62.

Dobritsa, A. A., W. van der Goes van Naters, C. G. Warr, R. A. Steinbrecht, and J. R. Carlson. 2003. Integrating the Molecular and Cellular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Neuron 37:827–841.

Eisner, T., and J. Meinwald. 1995. Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction. Page (T. Eisner and J. Meinwald, Eds.). National Academies Press, Washington, D.C.

Fatouros, N. E., M. E. Huigens, J. J. A. van Loon, M. Dicke, and M. Hilker. 2005. Butterfly anti-aphrodisiac lures parasitic wasps. Nature 433:704–704.

de Fouchier, A., X. Sun, G. Caballero-Vidal, S. Travaillard, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2018.

Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant Receptors. Frontiers in Behavioral Neuroscience 12:264.

de Fouchier, A., W. B. Walker, N. Montagné, C. Steiner, M. Binyameen, F. Schlyter, T. Chertemps, A. Maria, M.-C. François, C. Monsempes, P. Anderson, B. S. Hansson, M. C. Larsson, and E. Jacquin-Joly. 2017. Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. Page 15709 Nature Communications.

Gadenne, C., R. B. Barrozo, and S. Anton. 2016. Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? Annual Review of Entomology 61:317–333.

Gregg, P., A. Del Socorro, and G. Henderson. 2010. Development of a synthetic plant volatile-based attracticide for female noctuid moths. II. Bioassays of synthetic plant volatiles as attractants for the adults of the cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Australian Journal of Entomology 49:21–30.

Hansson, B. S., and M. C. Stensmyr. 2011. Evolution of Insect Olfaction. Neuron 72:698–711.

Huigens, M. E., F. G. Pashalidou, M. H. Qian, T. Bukovinszky, H. M. Smid, J. J. A. Van Loon, M. Dicke, and N. E. Fatouros. 2009. Hitch-hiking parasitic wasp learns to exploit butterfly antiaphrodisiac. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:820–825.

Katritzky, A. R., Z. Wang, S. Slavov, M. Tsikolia, D. Dobchev, N. G. Akhmedov, C. D. Hall, U. R. Bernier, G. G. Clark, and K. J. Linthicum. 2008. Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure. Proceedings of the National Academy of Sciences 105:7359–7364.

Kepchia, D., P. Xu, R. Terryn, A. Castro, S. C. Schürer, W. S. Leal, and C. W. Luetje. 2019. Use of machine learning to identify novel, behaviorally active antagonists of the insect odorant receptor co-receptor (Orco) subunit. Scientific Reports 9:4055.

Leal, W. S. 2013. Odorant Reception in Insects : Roles of Receptors , Binding Proteins , and Degrading Enzymes. Annual Review of Entomology is 58:373–391.

Leal, W. S. 2014. Deciphering the Rosetta Stone of Insect Chemical Communication. American Entomologist 60:223–230.

Leal, W. S. 2017. Reverse chemical ecology at the service of conservation biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114:12094–12096.

Mansouri, K., and R. S. Judson. 2016. In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity 1425.

McCormick, A. C., G. A. Boeckler, T. G. Köllner, J. Gershenzon, and S. B. Unsicker. 2014. The timing of herbivore-induced volatile emission in black poplar (Populus nigra) and the influence of herbivore age and identity affect the value of individual volatiles as cues for herbivore enemies. BMC Plant Biology 14.

Nyasembe, V. O., and B. Torto. 2014. Volatile phytochemicals as mosquito semiochemicals. Phytochemistry Letters 8:196–201.

Oliferenko, P. V., A. A. Oliferenko, G. I. Poda, D. I. Osolodkin, G. G. Pillai, U. R. Bernier, M. Tsikolia, N. M. Agramonte, G. G. Clark, K. J. Linthicum, and A. R. Katritzky. 2013. Promising Aedes aegypti Repellent Chemotypes Identified through Integrated QSAR, Virtual Screening, Synthesis, and Bioassay. PLoS ONE 8:1–13.

Poitout, S., and R. Bues. 1974. Elevage de chenilles de vingt-huit especes de Lepidopteres Noctuidae et de deux especes d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularites de l'elevage selon les especes. Annales de Zoologie 6:431–441.

Poivet, E., K. Rharrabe, C. Monsempes, N. Glaser, D. Rochat, M. Renou, F. Marion-Poll, and E. Jacquin-Joly. 2012. The use of the sex pheromone as an evolutionary solution to food source selection in caterpillars. Nature Communications 3:1047.

Ray, A. 2015. Reception of odors and repellents in mosquitoes. Current Opinion in Neurobiology 34:158–164.

Rostelien, T., M. Stranden, A. K. Borg-Karlson, and H. Mustaparta. 2005. Olfactory receptor neurons in two heliothine moth species responding selectively to aliphatic green leaf volatiles, aromatic compounds, monoterpenes and sesquiterpenes of plant origin. Chemical Senses 30:443–461.

Saveer, A. M., S. H. Kromann, G. Birgersson, M. Bengtsson, T. Lindblom, A. Balkenius, B. S. Hansson, P. Witzgall, P. G. Becher, and R. Ignell. 2012. Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 279:2314–2322.

Seidelmann, K., K. Luber, and H. J. Ferenz. 2000. Analysis of release and role of benzyl cyanide in male desert locusts, Schistocerca gregaria. Journal of Chemical Ecology 26:1897–1910.

Smid, H. M., J. J. A. Van Loon, M. A. Posthumus, and L. E. M. Vet. 2002. GC-EAG-analysis of volatiles from Brussels sprouts plants damaged by two species of Pieris caterpillars: Olfactory receptive range of a specialist and a generalist parasitoid wasp species. Chemoecology 12:169–176.

Tauxe, G. M., D. Macwilliam, S. M. Boyle, T. Guda, and A. Ray. 2013. Targeting a Dual Detector of Skin and CO 2 to Modify Mosquito Host Seeking. CELL 155:1365–1379.

Tropsha, A., and A. Golbraikh. 2007. Predictive QSAR Modeling Workflow, Model Applicability Domains, and Virtual Screening. Current Pharmaceutical Design 13:3494–3504.

Tropsha, A., P. Gramatica, and V. K. Gombar. 2003. The importance of being earnest: Validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. QSAR and Combinatorial Science 22:69–77.

Witten, I. H., E. Frank, and M. A. Hall. 2016. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques. Page (M. P. I. Kaufman, Ed.). Fourth edi.

Witzgall, P., P. Kirsch, and A. Cork. 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. Journal of Chemical Ecology 36:80–100.

Zhang, L., D. Fourches, A. Sedykh, H. Zhu, A. Golbraikh, S. Ekins, J. Clark, M. C. Connelly, M. Sigal, D. Hodges, A. Guiguemde, R. K. Guy, and A. Tropsha. 2013. Discovery of novel antimalarial compounds enabled by QSAR-based virtual screening. Journal of Chemical Information and Modeling 53:475–492.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES:

1. Pourquoi choisir la larve comme cible d'étude ? Quel est l'intérêt d'étudier l'olfaction chez la larve de *S. littoralis* ?

Chez les lépidoptères le rôle des adultes consiste principalement à chercher un partenaire sexuel pour s'accoupler, les femelles ont ensuite l'importante tâche de chercher un lieu propice pour la ponte pour assurer la survie de la progéniture (Powell 2009). Les chenilles passent la plupart de leur temps à se nourrir et stocker des réserves pour un bon développement corporel jusqu'à la métamorphose. La majorité des chenilles de l'ordre des Lépidoptères sont phytophages, présentant des comportements alimentaires qui varient considérablement et sont souvent assez spécifiques pour une famille, un genre ou une espèce. En plus des chenilles se nourrissant des feuilles, il existe également des mineuses de feuilles, de tiges ou des chenilles se nourrissant de galles développées par les plantes (Powell 2009).

L'utilisation des différents sens, tels que la vue et l'olfaction, est particulièrement importante chez les insectes afin de localiser les sources de nourriture. Balkenius et al. (2006) ont démontré que *Macroglossum stellatarum,* un papillon diurne, dépend principalement de stimuli visuels pour localiser ses sources de nourriture, tandis que *Deilephila elpenor,* un papillon nocturne, est attiré principalement par les odeurs. *Deilephila elpenor* est capable de détecter également les couleurs, mais seulement en présence d'une odeur, ce qui indique que les espèces diurnes et nocturnes donnent un poids différent aux deux modalités sensorielles. Il semblerait donc que les papillons nocturnes ont privilégié le sens de l'odorat, non seulement pour la communication sexuelle à longue distance mais également pour la recherche de plantes hôtes. Les chenilles des lépidoptères présentent une vision rudimentaire. Elles ne possèdent pas d'yeux composés mais des ocelles (Calatayud et al. 2013). La détection de la lumière peut se faire aussi par des tissus distincts de l'œil ou extra oculaires (*e.g.* l'épiderme) (Eacock et al. 2019).

Les chenilles sont capables de s'orienter de manière sélective vers des stimuli olfactifs émis par une plante ou par leurs congénères. De nombreuses espèces de lépidoptères ont des chenilles qui effectuent des dispersions aériennes durant leur premier ou second stade de développement, en se laissant entraîner par le vent, par un fil de soie qu'elles sécrètent, c'est le cas chez *S. littoralis* ; ces chenilles sont donc amenées à faire un choix de plante hôte après l'atterrissage (Thiéry et al. 2013). Par ailleurs, si pendant les premiers stades larvaires les chenilles émergées d'une même ponte se côtoient, elles se dispersent chez de nombreuses espèces à mesure que leurs besoins alimentaires augmentent. Là aussi elles vont être amenées à faire un choix de plantes où se nourrir. Le système olfactif apparaît comme une bonne cible pour mieux comprendre les préférences d'hôtes des larves de noctuelles, car bien qu'il soit moins complexe que celui des adultes, il contient également des neurones sensoriels olfactifs. Plus concrètement, chez *S. littoralis,* nous avons trouvé 44 OR et 22 IR dans le transcriptome larvaire, nombre qui indique que la larve de ce lépidoptère phytophage possède un large équipement olfactif compatible avec une grande capacité de détection olfactive, plus élaborée qu'on ne le pensait.

Mon étude s'est focalisée sur le stade larvaire des lépidoptères car c'est le stade ravageur qui cause des dégâts importants aux cultures, et le fait de savoir comment la larve perçoit les odeurs de son environnement et comment elle y réagit pourrait aider à établir des méthodes de lutte contre ces insectes lors de la présence des larves dans le champ. Ainsi, en utilisant des odeurs à effet attractif ou répulsif, un contrôle de populations de chenilles peut être envisagé, avec une méthode basée sur l'olfaction, inoffensive pour l'environnement et d'autres animaux.

L'intérêt d'étudier particulièrement *Spodoptera littoralis* repose sur le fait qu'en plus d'être un ravageur des cultures présent dans le bassin méditerranéen et maintenant en France, des études approfondies au cours des dernières années ont permis d'explorer différents aspects du système olfactif périphérique et central, principalement au stade adulte (Couton et al. 2009, Binyameen et al. 2012, 2014, de Fouchier et al. 2017). Un large éventail de volatils de plantes actifs sur la physiologie olfactive ou le comportement de ces papillons est par ailleurs également connu. Néanmoins, des études sur les chenilles, réalisées avant mes travaux de thèse, ont permis d'aborder les questions de la détection de la phéromone sexuelle par les larves, de la comparaison des gènes olfactifs exprimés entre les chenilles et les adultes (Thèse Poivet 2012), ainsi que de la corrélation entre l'activation de certains OR et le comportement des chenilles (de Fouchier et al. 2018). *Spodoptera littoralis* était donc un très bon modèle pour aborder en détail, au cours de ma thèse, les bases moléculaires de l'olfaction chez les chenilles, en intégrant différentes méthodes telles que la transcriptomique, la chimio-informatique, l'étude fonctionnelle des récepteurs en utilisant des techniques d'électrophysiologie et finalement le comportement, donc en allant des gènes jusqu'au comportement.

2. L'équipement des chenilles en transcrits chimiosensoriels est plus large qu'initialement montré, mais existe-t-il des gènes spécifiquement exprimés chez les chenilles ?

Le transcriptome larvaire réalisé pendant ma thèse a permis d'élargir le répertoire connu de gènes chimiosensoriels exprimés au stade ravageur. S'il est vrai qu'un transcriptome larvaire avait déjà été réalisé précédemment (Poivet et al. 2013), les méthodes de séquençage actuellement disponibles nous ont permis d'obtenir une profondeur de séquençage beaucoup plus importante, permettant d'identifier de nouveaux gènes exprimés, et ce même à des niveaux très faibles.

Nous avons réalisé l'assemblage du transcriptome des chenilles du stade L4 (voir chapitre 1). Ce nouvel assemblage a permis de doubler le nombre connu de gènes d'OR exprimés chez les chenilles, en allant de 22 à 44 OR. Le nombre de GR exprimés a augmenté considérablement, passant de 3 à 37, ainsi que le nombre d'IR qui est passé de 10 à 22. Cette augmentation considérable du nombre des gènes chimiosensoriels qui sont exprimés au 4ème stade larvaire renforce l'idée que le système olfactif des chenilles n'est pas aussi simple qu'imaginé, mais qu'il comporte un grand nombre de récepteurs spécialisés pour la détection de différents types d'odorants.

Nous avons fait des progrès à l'aide de ce nouveau transcriptome et du séquençage du génome (publication en préparation) et nous avons identifié de nouveaux gènes chimiosensoriels dont certains exprimés aux stades adulte et larvaire, et certains potentiellement spécifiques des larves.

En particulier, j'ai pu identifier 5 nouveaux OR dans ce transcriptome qui n'avaient pas été répertoriés précédemment dans les organes chimiosensoriels des adultes (Walker et al. 2019, Koutroumpa et al. in prep). J'ai donc fait l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de récepteurs spécifiquement exprimés au stade larvaire, et qui pourraient détecter des odorants particulièrement importants pour des fonctions vitales chez les chenilles. Pour le vérifier, j'ai utilisé la RT-PCR sur des ARN extraits des antennes des adultes et des antennes et des maxilles des larves (voir article 1 annexes, de Fouchier et al. 2018). Cependant, pour beaucoup de gènes, les résultats obtenus en RT-PCR n'étaient pas assez reproductibles (variation entre les trois réplicas), ce qui ne nous a pas permis de valider cette hypothèse. Il y a plusieurs explications possibles à ce problème. Premièrement, cela pourrait provenir des amorces testées ; les amorces oligonucléotidiques que j'ai dessinées n'étaient peut-être pas assez spécifiques (il existe des domaines assez conservés entre certains OR). Une perspective serait de dessiner d'autres amorces pour les OR ciblés et de refaire la RT-PCR avec ces amorces, et il serait également possible de faire varier la température d'hybridation. Puis le séquençage des fragments amplifiés permettrait de vérifier la spécificité de l'amplification. Deuxièmement, il est possible que certains gènes soient exprimés à un très faible niveau, expliquant que l'amplification de leur transcrit soit aléatoire, selon l'abondance des autres transcrits similaires. Ainsi, une autre stratégie serait de réaliser une qPCR (PCR quantitative en temps réel) pour quantifier les niveaux d'expression d'OR dans chaque stade de développement. Ceci permettrait d'avoir des données quantitatives précises sur l'expression de ces récepteurs. Enfin, il est possible que l'expression de ces gènes varient au cours du développement larvaire ou du sexe de la chenille. Comme il est difficile de connaître avec certitude le stade larvaire exact lors des dissections ou le sexe, il est tout à fait possible que l'on ait obtenu des ARN contaminés par des stades L3 ou L5 ou certains enrichis en mâles ou en femelles, expliquant une amplification non homogène. Une amélioration serait de suivre avec précision les stades larvaires (suivi des mues par exemple) et de disséquer les chenilles après prélèvement des organes chimiosensoriels pour déterminer leur sexe (visualisation des futurs testicules). S'il s'avère que des gènes chimiosensoriels sont différentiellement exprimés selon les stades larvaires, qui ont des besoins alimentaires différents, ce serait une découverte pertinente.

Toutes ces vérifications doivent encore être effectuées, par conséquent, nous ne pouvons pas conclure avec certitude que les 5 OR nouvellement identifiés chez les chenilles sont spécifiques de ce stade simplement sur la base du fait qu'ils n'ont été trouvés que dans le transcriptome larvaire.

Nous pouvons supposer que si un nouveau transcriptome des organes olfactifs de *S. littoralis* adultes était réalisé avec la même profondeur de séquençage que celle obtenue pour le transcriptome larvaire décrit ici, de nouveaux OR seraient identifiés aussi chez les adultes, y compris certains des OR considérés ici comme potentiellement spécifiques des larves.

⇒ ***Apport du transcriptome à l'analyse du génome aujourd'hui séquencé, complémentarité de approches***

Le séquençage tout récent du génome de *S. littoralis* (*in prep*) et l'annotation des gènes chimiosensoriels a permis d'y retrouver les cinq OR exprimés au stade larvaire, mais les séquences y sont très courtes (incomplètes). A l'inverse, le transcriptome larvaire a aidé à l'annotation de certains récepteurs qui n'avaient pas été remarqués lors de l'annotation automatique du génome.

Ces deux techniques sont donc complémentaires, apportant chacune des éléments spécifiques sur l'ensemble des gènes présents et exprimés chez une espèce. Le génome permet d'avoir le nombre total des gènes chez une espèce, de découvrir des pseudogènes, ou d'identifier des phénomènes d'épissage alternatif, à la différence du transcriptome qui est réalisé sur des tissus et/ou dans des conditions spécifiques, et donc qui ne révèle que les gènes exprimés dans un endroit donné et dans une condition donnée.
Par exemple, l'analyse d'un premier transcriptome de *Thermobia domestica* (Ordre Zygentoma, insecte ancestral) a permis d'identifier trois transcrits d'Orco mais aucun OR, proposant l'hypothèse que les OR seraient apparus plus tard au cours de l'évolution des insectes à partir d'Orco, (Missbach et al. 2014). Mais l'analyse du génome de cette espèce a finalement révélé l'existence d'un système OR/Orco (Brand et al. 2018). Il est possible que le stade de développement choisi pour le transcriptome n'était pas adéquat ou bien que les OR ont un niveau très bas d'expression.

⇒ ***Absence d'Orco dans les palpes ?***

Bien que présent dans le transcriptome larvaire réalisé pendant ma thèse, le transcrit du récepteur ubiquitaire Orco n'a pu être identifié dans les palpes maxillaires des chenilles. Ce résultat est surprenant car des transcrits d'OR ont été identifiés dans les palpes, et leur bon fonctionnement doit nécessiter la présence d'Orco. Nous avons vérifié les différentes étapes bioinformatiques d'alignement des échantillons RNAseq de palpes maxillaires sur le transcriptome et de comptage des reads, en retrouvant ce résultat. Nous ne pouvons pas exclure le fait que des problèmes de séquençage RNAseq aient pu se produire, ce qui pourrait expliquer l'absence d'Orco dans les palpes des chenilles. Il est possible que des artefacts et des biais qui n'ont pas été identifiés ou contrôlés auparavant soient la raison de ce résultat inattendu (McGettigan 2013). Il faudrait bien sur maintenant conduire une qPCR sur des ADNc de palpes maxillaires afin de vérifier cet étrange résultat. Lors des RT-PCR réalisées sur les antennes et les maxilles, une faible expression d'Orco semblait néanmoins avoir été détectée (annexe 1, de Fouchier et al. 2018). Si jamais il s'avérait qu'Orco était effectivement absent des palpes maxillaires, nous pourrions émettre plusieurs hypothèses. Tout d'abord, il est possible que les OR présents dans les palpes ne soient pas fonctionnels. La détection des protéines d'OR (par immunologie par exemple) permettrait déjà de voir s'ils sont bien adressés à la membrane des dendrites. Ensuite, des enregistrement électrophysiologiques sur les palpes permettraient de vérifier s'il y a bien une réponse olfactive de ces organes (Roessingh et al. 2007). Une autre hypothèse serait qu'Orco ne serait pas toujours indispensable pour la détection des odeurs. Stengl and Funk (2013) ont affirmé que les OR assurent la médiation des réponses odorantes également en l'absence d'Orco. Certaines études ont montré que lorsque des OR de différentes espèces d'insectes ont été exprimés sans Orco dans des tests d'expression hétérologue, des réponses spécifiques au ligand ont été observées (Wetzel et al. 2001, Sakurai et al. 2004, Nakagawa et al. 2005, Neuhaus et al. 2005). Cependant, des concentrations d'odeurs assez élevées avec de longues expositions étaient nécessaires pour obtenir des réponses (Stengl and Funk 2013). Néanmoins, les réponses odorantes étaient plus optimales quand Orco était coexprimé avec les OR (Nakagawa et al. 2005, Neuhaus et al. 2005, Smart et al. 2008, Stengl and Funk 2013).

3. Le codage olfactif périphérique diffère-t-il entre les chenilles et les adultes ?

Comme cela a été détaillé dans la synthèse bibliographique (partie II, section 1.3), le codage périphérique est la première étape dans la transformation des stimuli chimiques externes en un message électrique qui sera traduit en un comportement chez l'insecte. Ce codage est appelé périphérique car il s'effectue en périphérie du système nerveux central, au niveau des organes olfactifs. Chez les chenilles, ce système périphérique est réduit par rapport à celui des adultes. Ainsi, moins de récepteurs sont exprimés chez les larves que chez les adultes.

Chaque OSN exprime généralement un seul type d'OR. Ainsi selon la règle "un OR par neurone", le nombre d'OR exprimés détermine le nombre de type fonctionnels d'OSNs chez l'adulte (Couto et al. 2005). Chez les adultes, il existe des milliers d'OSN dans les antennes. Le nombre d'OR exprimés chez les adultes étant d'environ 60 (Walker et al. 2019), il en découle qu'il doit exister des types fonctionnel d'OSN représentés par un grand nombre d'OSN. La capacité à détecter certaines molécules est donc dépendante du nombre d'OSN dans un type donné. Par exemple, les mâles de *S. littoralis* détectent le composé majoritaire de la phéromone sexuelle par un seul OR mais par l'activation d'un très grand nombre d'OSN. Mais qu'en est-il chez les chenilles qui ne possèdent qu'un tout petit nombre d'OSN ?

Les antennes de chenilles de la noctuelle *Heliothis virescens* possèdent environ 38 OSN (Zielonka et al. 2016). Bien que ce chiffre ne soit pas encore déterminé pour *S. littoralis*, on peut émettre l'hypothèse que ses antennes abritent un nombre équivalent d'OSN. L'étude du transcriptome a révélé que 37 transcrits d'OR sont exprimés dans les antennes de chenilles, soit un chiffre très proche du nombre d'OSN. Ceci nous mène à l'hypothèse 1 OR-1 OSN, proche de ce qui a été décrit chez la drosophile : chez les larves de drosophile, 25 OR ont été détectés pour 21 OSN (Fishilevich et al. 2005). Même si le nombre d'OSN exprimant le même OR est bien plus faible que chez les adultes (proche de 1), il a été démontré chez les larves de drosophile que la détection de la plupart des odorants résulte d'un codage combinatoire périphérique, avec une certaine redondance fonctionnelle des OSN (Fishilevich et al. 2005).

La situation est un peu différente pour les palpes maxillaires, où nous avons identifiés 16 transcrits d'OR. Trois sensilles des palpes ont vraisemblablement une fonction olfactive, abritant trois ou quatre OSN chacune (Grimes and Neunzig 1986, Schoonhoven 1987). Cela porte à une douzaine le nombre potentiel d'OSN dans les palpes. Nous avons donc un nombre plus important d'OR que d'OSN, ce qui suggère que certains OR doivent être coexprimés au sein d'un même OSN. Cela a été démontré chez la drosophile adulte, où certains OSN des antennes et des palpes coexpriment deux OR différents (Couto et al. 2005, Ray et al. 2007). Chez la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis*, certaines classes d'OSN expriment également jusqu'à cinq types de récepteurs (Koutroumpa et al. 2014), et chez le moustique *A. gambiae*, quatre à six OR différents sont coexprimés dans deux classes d'OSN dans l'antenne (Karner et al. 2015). Bien sûr cette éventuelle co-expression d'OR dans les OSN des palpes des chenilles de S. littoralis reste à vérifier, par exemple par hybridation *in situ*. Si cela se vérifie, la contribution des antennes et des palpes à la

discrimination olfactive serait différente, la coexpression de deux récepteurs fonctionnels offrant la possibilité d'une intégration et d'un traitement du signal olfactif dans les OSN.

Une approche qui pourrait donner des informations plus précises sur le codage olfactif périphérique serait l'utilisation de stratégies d'optogénétique et d'imagerie fonctionnelle, où l'on peut enregistrer l'activation des neurones *in vivo* et mesurer les réponses face aux stimuli. Les deux techniques sont très complémentaires et peuvent aider à définir les neurones nécessaires et / ou suffisants pour des comportements donnés (Simpson and Looger 2018). Une étude d'olfactogénétique réalisée sur la drosophile, en utilisant une lignée marquée ou « labelled line » pour des OR avec des ligands hautement spécifiques comme c'est le cas d'OR56a activé par le géosmine, permet d'étudier la façon dont l'activation combinée d'OSN produit un comportement complexe (Chin et al. 2018). Cette approche a permis d'identifier encore plus de types de neurones olfactifs impliqués dans la transmission d'informations olfactives importantes à des circuits olfactifs fortement modulés ou influençant l'activité d'autres OSN dans des environnements d'odeurs complexes (Bell and Wilson 2016, Chin et al. 2018). Bien que l'utilisation de cette technique reste limitée à la drosophile, il serait intéressant d'essayer de mettre en place l'olfactogénétique dans des organismes non modèles, et notamment chez les larves pour lesquelles des OR/ligands spécifiques ont été trouvées. Mais pour mieux comprendre le codage périphérique des odeurs par les chenilles il est nécessaire tout d'abord de connaître la fonction des OR qu'elles expriment. C'est ce qui a fait l'objet de la plupart de mes travaux de thèse, par expression hétérologue des OR en OSN de drosophile couplée à l'enregistrement monosensillaire, et qui sera discuté plus en détail dans le point suivant.

4. Caractérisation fonctionnelle des OR : une étape encore difficile

La déorphanisation des récepteurs olfactifs a beaucoup progressé ces dernières années, ainsi la fonction des récepteurs olfactifs de plusieurs espèces d'insectes a été identifiée en utilisant différentes techniques comme présenté dans la synthèse bibliographique (partie 1.3.2). Or, cela ne signifie pas que la tâche est actuellement plus facile. Trouver la fonction des récepteurs représente toujours un degré de difficulté considérable. Deux points seront particulièrement détaillés ici car ils se réfèrent à des difficultés rencontrées au cours de ma thèse : 1) l'expression des gènes d'intérêt dans un organisme étranger n'est pas toujours garantie, et 2) l'identification des ligands actifs sur les récepteurs peut avoir un coût considérable (argent et temps), car l'espace odorant est potentiellement très large et une quantité considérable de molécules doit être testée pour identifier celles qui seront actives pour chaque récepteur.

⇒ ***Expression hétérologue d'OR d'insectes et enregistrement de réponse :***

In vitro

Dans mon projet de thèse, il était prévu au départ l'implémentation d'une approche *in vitro*, à savoir l'utilisation d'un système automatisé de criblage avec la technique TEVC (« Two-electrode voltage clamp ») couplé au robot HiClamp, pour la déorphanisation à haut débit des OR.

Les preuves de concept réalisées avant mon arrivée au laboratoire ont montré l'efficacité de ce système pour l'analyse fonctionnelle d'un SlitOR (SlitOR28). J'ai donc effectué deux séjours pendant ma première et deuxième année de thèse, au Centre de Ressources de Xénope (CRB) à Rennes et qui possède le robot HiClamp, pour participer à la mise au point de cette méthode.

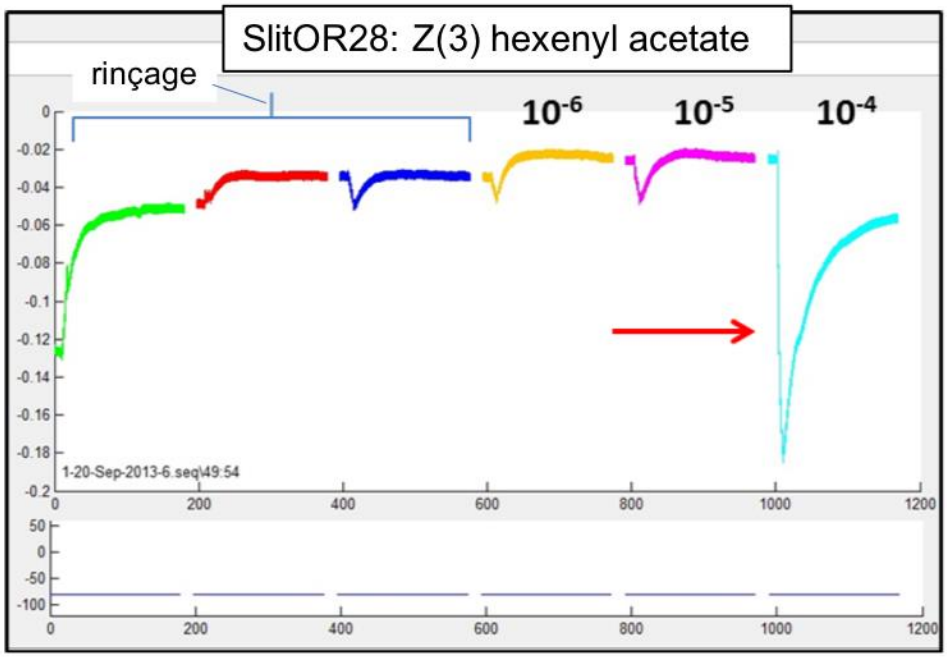


Figure 39. Résultats positifs obtenus lors de la preuve de concept du projet. Réponses d'un ovocyte exprimant SlitOR28+ SlitOrco testé successivement (de gauche à droite) dans trois puits contenant la solution de rinçage, puis dans 4 puits contenant des dilutions croissantes du meilleur ligand identifié pour ce récepteur : le Z(3) hexenyl acetate (de Fouchier et al. 2017). On observe une réponse dose/dépendante et qui sature à forte dilution (10^{-3}).

J'ai également réalisé un séjour de recherche à Pékin en Chine en mai et juin 2017, pour apprendre le fonctionnement de la technique du voltage clamp manuel sur ovocytes de xénope tout en collaborant sur le projet ANR PRISM mené par mon co-directeur de thèse, et qui a fait l'objet de la thèse de Lucie Bastin-Héline, doctorante avec qui j'ai réalisé les expériences de biologie moléculaire et électrophysiologie en Chine (voir article 2 Bastin-Héline et al. (2019) en annexe).

Le système manuel de voltage clamp est simple et facile à manipuler. Une fois que l'ovocyte est bien placé dans le dispositif (après injection de l'ARNc correspondant à l'OR à étudier et incubation pendant au moins 3 jours), on place les deux électrodes sur les ovocytes qui expriment l'OR d'intérêt et on mesure le courant électrique qui passe au travers de la membrane de l'ovocyte suite à la stimulation par la molécule testée. L'avantage de cette technique repose sur sa simplicité, on peut clamper les ovocytes facilement et on peut mesurer des courants même lorsque les ovocytes ont subi des séquelles mineures lors de l'injection (ils sont toujours viables et peuvent exprimer le récepteur). Cependant, le point négatif de cette technique est l'utilisation des quantités considérables d'odorants pour préparer les dilutions. Dans ce système, les stimulations se font par contact entre l'ovocyte et les dilutions d'odorants pendant quelques secondes. Pour chaque

ovocyte, plusieurs millilitres de dilution sont requis et cette dilution ne peut pas être réutilisée, ce qui consomme beaucoup de produit.

Dans le Centre de Ressources de Xénope (CRB) à Rennes, j'ai eu l'opportunité de travailler avec la même technique mais en utilisant le robot HiClamp, pour le criblage automatique de SlitOR. Le robot HiClamp est un système qui permet de tester des ovocytes de façon automatisée et présente plusieurs avantages. D'abord seules de petites quantités de dilutions d'odorants sont nécessaires, car au lieu d'appliquer des solutions aux ovocytes, le HiClamp transporte l'ovocyte successivement dans les puits d'une plaque 96 puits de petit volume (100 µl) qui contiennent les composés à tester, et la plaque est réutilisable. Le HiClamp peut être programmé pour tester plusieurs ligands et plusieurs ovocytes exprimant différents gènes (deux plaques de 96 puits, une pour les ovocytes, une pour les ligands). Une fois programmé, le HiClamp peut fonctionner jour et nuit. Grâce à tous ces avantages, ce système est aujourd'hui très utilisé en pharmacologie. Cependant, nous avons rencontré plusieurs obstacles pour sa mise au point pour la déorphanisation haut-débit des OR. La première a été l'observation de possibles contaminations entre les puits de ligands, car bien que dilués, les ligands sont des composés volatils qui peuvent s'évaporer et contaminer les puits adjacents de la plaque. En effet, en utilisant comme contrôle des OR dont les ligands étaient connus, nous avons observé des réponses à des composés non-ligands. Avant d'avoir pu maîtriser ces contaminations (installation du robot sous une hotte aspirante), nous avons ensuite été confrontés à des problèmes de qualité des œufs de xénope. Ainsi le système HiClamp a été essayé par Guillaume Audic (IE CRB) pendant une période de plus d'un an et demi à Rennes, période où je l'ai assisté au cours de deux séjours de 3 mois, sans obtenir de résultats concluants. La cause principale a été la mauvaise qualité du matériel biologique. Des contaminations bactériennes dans les élevages de Xénopes ont entraîné des problèmes de viabilité des ovocytes (dégradation/mort cellulaire), et donc quasiment aucun ovocyte ne pouvait être passé sur le robot (figure 40).



Figure 40. Ovocytes de xénopes après 24 heures du traitement de défolliculariſation avec collagénase.

Les ovocytes ont été traités avec des antibiotiques, traitement qui a permis d'améliorer leur qualité, et enfin quelques ovocytes ont réussi à passer le test de qualité sur le robot, mais les résultats montraient des profils atypiques et des signaux peu reproductibles.

Face à toutes ses difficultés, des nombreux questionnements sur différents paramètres sont apparus : les récepteurs étaient-ils correctement exprimés ? Le temps d'incubation après injection était-il suffisant ? L'utilisation d'antibiotiques aurait-il un effet d'inhibition sur l'ovocyte ? Les quantités d'ARNc injectées étaient-elles suffisantes ? Les plasmides utilisés contenaient-ils bien des séquences d'OR ? Les gènes clonés étaient-ils bien les gènes d'intérêt ? entre autres multiples hypothèses…

Pour chaque hypothèse nous avons adopté des mesures correctives ; ainsi nous avons augmenté le temps d'incubation avant passage sur le robot, employé un contrôle GFP sous le même promoteur que les OR, injecté les OR sous forme d'ADN (plasmide) ou d'ARNc à différentes quantités (contrôlées au Nanodrop), et vérifié la taille et la séquence des gènes clonés, entre autres. Également, nous avons testé plusieurs doses d'antibiotiques, de collagénase, utilisé des matériaux stérilisés, changé les poudres utilisées pour préparer les solutions nutritives pour les ovocytes, etc.

Malgré tous nos efforts, nous avons obtenu très peu de réponses semblables à celles obtenues pendant la preuve de concept. En injectant des ARNc, comme dans la plupart des travaux publiés, nous n'avons obtenu que deux réponses correctes sur 36 ovocytes clampés pendant la première année.

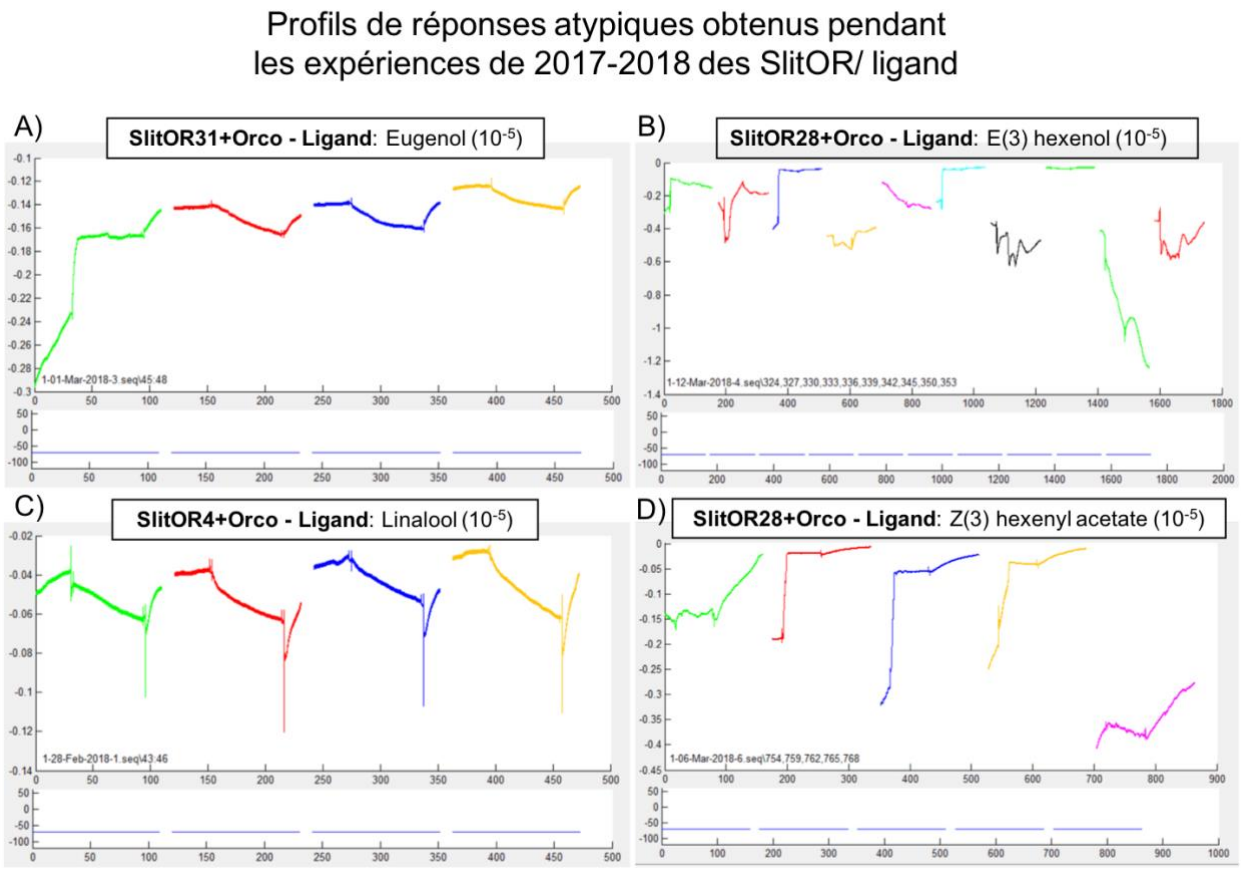


Figure 41. Profils des réponses atypiques d'ovocytes de xénope exprimants des SlitOR+ SlitOrco testés avec des ligands connus (de Fouchier et al. 2017) à une dilution de 10^{-5}. A) Ovocyte exprimant SlitOR31+Orco, testé avec l'eugénol. B) Ovocyte exprimant SlitOR28+Orco et testé avec leE(3)-hexenol. C) Ovocyte exprimant SlitOR4+Orco et testé avec le linalool. D) Ovocyte exprimant SlitOR28+Orco et testé avec le Z(3) hexenyl acetate. Chaque pic représente le passage d'un ovocyte dans la molécule testée.

Malgré toutes ces tentatives, cette partie du projet a été abandonnée. Nous nous sommes demandés si le système HiClamp est vraiment adapté à l'étude des OR ? Le mode d'exposition utilisé par le HiClamp au laboratoire diffère du mode d'exposition utilisé classiquement dans la littérature en utilisant un système manuel de voltage-clamp (Zhang et al. 2013a, Wang et al. 2016). Le HiClamp expose les ovocytes par balnéation, c'est-à-dire que les récepteurs sont immédiatement en contact avec la concentration du ligand. La méthode par perfusion au contraire met en contact les récepteurs avec le ligand de manière plus progressive. Cette différence d'exposition entraîne-t-elle des différences de profils de réponse entre la littérature et les données obtenues avec le HiClamp ? L'application rapide du ligand sur un OR peut-elle entraîner une ouverture plus synchrone des canaux ioniques que l'exposition classique, se traduisant par un pic suivi d'un retour vers le potentiel de base (ou une oscillation) ? Au niveau de la littérature, les réponses montrent classiquement une dépolarisation moins rapide en utilisant le système manuel

de voltage clamp, cependant aucune étude de déorphanisation d'OR d'insecte n'a été reportée en utilisant cette technique automatisée.

Un autre point faible du robot HiClamp est la haute sélectivité sur la qualité des ovocytes, c'est un inconvénient car seuls les ovocytes en très bon état passeront le clamp, ce qui est délicat car après l'injection, quelques ovocytes sont déjà un peu abimés bien qu'ils sont toujours capables d'exprimer les OR.

Une bonne alternative serait d'utiliser le système manuel du TEVC, comme nous l'avons fait avec succès en Chine, où certaines conditions (choix de l'ovocyte à clamper, réglage des électrodes…), peuvent être contrôlées par l'utilisateur, contrairement au robot qui présente certains inconvénients (très sélectif , ne prend que les ovocytes en très bon état, une fois un cycle démarré, on ne peut pas l'arrêter facilement).Le robot a également un coût élevé, de plus il est recommandé de ne faire aucun changement sur le robot (aucun élément n'est remplaçable, en cas de problèmes techniques seule l'entreprise peut agir) donc tout ça peut entraîner des délais considérables qui peuvent être facilement évités avec le système manuel.
Pour toutes ces raisons, un poste manuel a maintenant été acquis au laboratoire de Versailles et est en cours d'installation, comme une alternative pour la déorphanisation des OR in vitro.

In vivo

Pour ma thèse nous avons donc décidé de changer de système, et d'exprimer les SlitOR des chenilles dans un système déjà bien connu au laboratoire, celui du « neurone vide» de la drosophile couplé à l'enregistrement monosensillaire (SSR ou Single Sensillum Recording) (Dobritsa et al. 2003) (voir synthèse bibliographique partie III, section 2.1.1). Ce système présente l'avantage d'être plus proche de la réalité physiologique de l'olfaction : stimulation aérienne par les molécules odorantes, pas de dilutions "artificielle", expression des OR en contexte "neurone" et a déjà fait ses preuves au laboratoire.

Cependant, le plus gros inconvénient de ce système est le temps nécessaire pour obtenir les lignées de drosophile qui expriment les SlitOR d'intérêt. Nous avons donc sélectionné un petit nombre d'OR à étudier, en choisissant les cinq OR potentiellement spécifiques des larves (identifiés dans mon transcriptome larvaire, chapitre 1)

J'ai testé sur ces OR un panel d'environ 40 molécules odorantes regroupant des composées divers (aromatiques, terpènes, GLV, etc). Parmi les cinq récepteurs, deux ont été activés par au moins trois molécules du panel, les autres récepteurs n'ont pas répondu significativement aux composées testées. Soit ces derniers n'étaient pas exprimés fonctionnellement, soit leur(s) ligand(s) ne faisaient pas partie du panel choisi. Nous penchons pour la deuxième hypothèse puisque les OSN exprimant ces OR présentaient tous une activité spontanée, ce qui laisse penser que les OR étaient bien exprimés.

Ceci illustre le défi de la recherche des ligands pour de nouveaux récepteurs. Vu la diversité des molécules odorantes, on peut tester de nombreuses molécules sans en identifier une seule qui active le récepteur. Notre panel n'était tout simplement peut-être pas assez large. Une autre hypothèse est que certains éléments de la détection olfactive sont absents, comme des OBP ou des CSP. Ces protéines seraient importantes pour la solubilisation des odorants dans la lymphe sensillaire et leur transport vers l'OR. Or, les sensilles ab3 de drosophile n'abritent pas les OBP ni CSP de *S. littoralis* (seul l'OR exogène est ajouté). Il est donc possible que le bon ligand ne puisse

pas atteindre son OR dans ce système hétérologue. Un autre point critique est la morphologie des organes olfactifs, qui est très variable entre la drosophile et *S. littoralis* (adulte et larve). La forme des sensilles et leur taille diffèrent énormément entre les chenilles d'un lépidoptère et celles de la drosophile, on ne peut donc pas exclure que la réception des odorants pourrait varier.

Une autre hypothèse serait que l'Orco endogène de la drosophile qui est exprimé avec les SlitOR ne serait pas complètement compatible avec tous les SlitOR, comme peut l'être l'Orco authentique de la noctuelle. Enfin, une dernière hypothèse pourrait être que certains OR, encore présents dans le génome et exprimés, auraient perdu leur fonction et seraient sur la voie de devenir des pseudogènes.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu déorphaniser deux nouveaux OR de *S. littoralis*, ce qui porte le nombre total de SlitOR caractérisés à 19, ce qui en fait le Lépidoptère pour lequel on connaît le mieux le rôle des OR. Récemment, un nouveau système de neurone vide chez la drosophile a été mis au point dans le laboratoire de J. Carlson à Yale University aux Etats-Unis (Chahda et al. 2019), qui permet de gagner du temps sur l'obtention des lignées transformées et qui pourrait à terme permettre d'envisager de caractériser l'ensemble de tous les OR de *S. littoralis.* Ce système permet d'obtenir des lignées stables que l'on peut garder et tester sans avoir besoin de lancer d'autres croisements (voir synthèse bibliographique partie III, section 2.1.3).

⇒ ***Les systèmes d'expression sont-ils équivalents ?***

- In vitro/In vitro :

Les cellules HEK et les ovocytes de Xénope sont les deux systèmes d'expression *in vitro* les plus couramment utilisés pour étudier la fonction des OR d'insectes (Wang et al. 2010, Zhang et al. 2013a, Corcoran et al. 2014, Yuvaraj et al. 2017). En xénope, les réponses des OR induites par le ligand sont mesurées en intensité de courant (nA), tandis que dans les cellules HEK, elles sont mesurées par le différentiel de fluorescence induite par la présence de calcium (%). Par ailleurs, il existe des différences dans les composants intra et extracellulaires et dans ces deux méthodes. Alors, peut-on vraiment comparer les résultats obtenus dans ces systèmes ? Une seule étude à ce jour s'est attachée à les comparer en exprimant les mêmes OR dans les deux systèmes (Hou et al. 2020). Comme les réponses absolues des deux systèmes ne peuvent pas être comparées, les auteurs ont déjà dû normaliser les réponses pour pouvoir les comparer. Si pour certains OR les résultats étaient très similaires, ils ont cependant montré que la sélectivité et la spécificité de certains OR dépendaient du système utilisé. En particulier, certains composés qui n'avaient pas eu d'effet sur les OR en cellules HEK se sont révélés actifs sur les OR en ovocytes, ce qui a permis de déorphaniser un nouveau récepteur (Hou et al. 2020). Ces résultats suggèrent que le système d'expression en ovocytes de xénope serait plus sensible que celui en HEK. Néanmoins, il est difficile de dire avec certitude quelle serait la méthode *in vitro* la plus efficace, car les réponses peuvent varier considérablement d'un récepteur à un autre.

- In vitro/In vivo :

En comparant les systèmes *in vitro,* particulièrement celui de l'expression en ovocytes de xénope, avec celui *in vivo* du « neurone vide » chez la drosophile, on peut affirmer de manière

générale que le système *in vitro* TEVC est plus approprié pour le criblage fonctionnel d'un grand nombre d'OR car il est plus rapide à mettre en œuvre. Le système du neurone vide est certes plus lent à mettre en œuvre, mais il a l'avantage de produire des lignées stables qui expriment les OR, qui peuvent donc être utilisées pendant plusieurs années pour l'étude approfondie d'un OR en particulier. A noter que le nouveau système de neurone vide évoqué plus haut (Chahda et al. 2019) permettra à l'avenir de gagner en temps.

Wang et al. (2016) affirment qu'une comparaison entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* n'est pas possible, car les données ne sont pas comparables (courants électriques vs fréquences de potentiel d'action). Cependant une normalisation est toujours possible, comme indiquée par Hou et al. (2020) pour les systèmes *in vitro* détaillés ci-dessus. A ce jour, il existe toutefois quelques données obtenues par les deux systèmes sur un même OR. Ainsi, certains OR d'anophèle ont été testés en xénope et en neurone vide. La comparaison des résultats des analyses fonctionnelles menées en « neurone vide » sur des OR du moustique *A. gambiae* par Carey et al. (2010) avec les résultats obtenus sur les mêmes OR exprimés en ovocytes de xénope (Wang et al. 2010) démontrent que pour certains OR, comme AgOR8, les mêmes composés (ou similaires) activent le récepteur dans les deux systèmes, mais les spectres de réponses varient. *In vivo,* le 3 octanone, suivi par le 1-hepten-3-ol, ont généré les réponses le plus élevées (>150 spikes/sec)(Carey et al. 2010), tandis que *in vitro,* le 1 octen-3-ol a été le meilleur ligand, suivi par le 1 hepten-3-ol et le 3 octanone (Wang et al. 2010). Un récepteur phéromonal de *S. littoralis* a également été étudié en utilisant l'expression en ovocytes de xénope et le système de neurone vide/Or67dGAL4, et les profils de réponse obtenus à une variété de composés phéromonaux se sont avérés très similaires entre les deux systèmes (Bastin-Héline et al., 2019). Cependant, ces études comparatives sont encore limitées, nous ne pouvons donc pas affirmer que les résultats sont toujours similaires entre ces systèmes.

Les différences de réponses d'OR entre les systèmes d'expression hétérologues suggèrent que les conclusions sur la fonction des OR individuels peuvent différer selon le système utilisé pour la déorphanisation (Hou et al. 2020). La comparaison des différents systèmes a mis en évidence divers avantages et inconvénients selon le système choisi, mais également selon l'objectif de l'étude.

Le deuxième point qui représente un grand défi dans le processus de déorphanisation d'OR est le choix du panel de composés à tester **sur les récepteurs :**

Étant donné qu'il n'est pas possible de tester toutes les combinaisons récepteur-ligand possibles, la plupart des études réalisées se limitent au mieux à quelques dizaines de composés, choisis soit parce que ce sont des sémiochimiques relativement communs, soit pour leur importance écologique (principaux composés émis par une plante hôte par exemple) soit parce qu'ils sont actifs sur le comportement ou la physiologie de l'insecte considéré.

L'utilisation de panels de molécules trop étroits peut avoir des conséquences sur l'interprétation des résultats. Ainsi certains récepteurs pour lesquels un seul ligand actif a été trouvé, peuvent à tort être considérés comme très spécifiques, alors qu'il est possible que d'autres composés non testés soient également actifs sur le récepteur.

⇒ ***Une méthode pour identifier des ligands d'importance écologique sans a priori : le GC-SSR***

Sachant que les insectes phytophages utilisent des mélanges de composés volatils libérés par les plantes pour sélectionner des hôtes pour l'alimentation et la ponte, une méthode utilisable pour l'identification de ligands d'OR combine la chromatographie gazeuse (GC), qui permet la séparation des composants d'un mélange complexe, et l'enregistrement des réponses neuronales de l'insecte (SSR) suite à la stimulation par les composés séparées par le GC. En résumé, les composants d'un extrait sont séparés par le chromatographe, dont la sortie de la colonne est divisée en deux : une partie va au détecteur du chromatographe, l'autre mène au flux d'air permanent destiné à l'électrophysiologie. En cas de réponse, le composé peut être identifié a posteriori soit par son temps de rétention sur chromatographie soit par spectrométrie de masse.

La technique combiné de GC-SSR a été déjà utilisée chez les femelles de *S. littoralis* par Binyameen et al. (2014). En utilisant cette approche, ils ont pu identifier de nouvelles classes fonctionnelles d'OSN et augmenter de plus 30% le nombre connu d'odorants actifs sur le système olfactif de cet insecte.

Dans le chapitre 2 de cette thèse, les détails sur l'utilisation de cette méthode appliquée non pas sur les sensilles de *S. littoralis* mais sur des drosophiles exprimant des SlitOR spécifiques, sont abordés.

L'avantage de cette technique repose sur le fait qu'on stimule l'insecte avec un mélange de molécules présentes dans un extrait, ce qui permet d'identifier plusieurs molécules actives en une seule fois, et les quantités testées sont proches ou égales aux quantités trouvées dans leur environnement naturel. Les réponses peuvent donc être corrélées avec l'importance écologique de ces molécules pour l'insecte, et non pas par l'utilisation de doses très concentrées, comme c'est le cas quand les molécules sont testées individuellement.

Cette méthode combinée de GC-SSR est considérée comme une approche sans *a priori*, car on teste des extraits sur les sensilles de l'insecte, sans savoir quels composés sont présents ou lesquels activeront un OR. Cependant la plupart de temps les extraits choisis sont issus des plantes hôtes, par conséquent on s'attend à ce que les OR de l'insecte soient activés par au moins un composant de l'extrait.

Dans l'étude présenté dans le chapitre 2, des extraits des plantes hôtes et non-hôtes ont été utilisés, permettant l'identification de nouvelles molécules, complétant ainsi le travail de déorphanisation précédemment réalisé par de Fouchier et al. (2017). Bien que cette étude ait inclus un grand nombre de récepteurs pour lesquels des ligands ont été trouvés, près de la moitié des récepteurs de *S. littoralis* sont encore "orphelins". Une bonne stratégie pour trouver leurs ligands en utilisant l'approche combiné de GC-SSR, serait d'utiliser des extraits de diverses sources, non seulement de plantes, mais aussi d'extraits de larves, d'excréments larvaires, de sol (substrat de vie des nymphes), de fruits de plantes hôtes, d'insectes (prédateurs, parasitoïdes…), et refaire une étude approfondie de GC-SSR avec ces extraits pour chaque OR qui n'a pas encore été testé. Ceci permettrait de mieux comprendre les capacités olfactives, en faisant le lien entre les réponses neuronales et les molécules d'importance écologique pour cette espèce.

⇒ ***Approches indirectes pour aider à la déorphanisation des OR***

- La méthode DREAM : une approche peu reproductible

Une autre méthode indirecte utilisable pour l'identification de ligands potentiels d'OR est celle du DREAM (Déorphanisation des récepteurs basés sur des altérations de l'expression des niveaux d'ARNm). Dans cette méthode mise au point chez la souris, l'exposition à des concentrations artificiellement élevées d'un odorant conduit à des altérations des niveaux d'ARNm des OR qui lient cet odorant (Von Der Weid et al. 2015). La comparaison des niveaux d'expression des récepteurs avant et après une exposition aux odeurs peut donc aider à identifier les interactions ligand-récepteur *in vivo* sans avoir besoin d'autres outils génétiques.

Le principe du DREAM a été appliqué à un nombre limité d'OR chez *D. melanogaster* et les résultats étaient similaires à ceux obtenus pour les OR de souris. Cela suggérait que cette technique était utilisable pour identifier des ligands potentiels pour des OR d'insectes (Von Der Weid et al. 2015).

Cependant Koerte et al. (2018) ont testé cette méthode sur d'autres récepteurs déjà deorphanisés chez la drosophile, et ils ont identifié plusieurs cas pour lesquels les ligands confirmés n'ont pas induit d'altérations des niveaux d'ARNm des récepteurs chimiosensoriels correspondants, et d'autres pour lesquels les niveaux de transcription des gènes ont été modifiés même s'il n'y avait aucune preuve d'une interaction ligand-récepteur. Des expériences similaires menées au sein du laboratoire sur quelques OR déorphanisés de *S. littoralis* ont conduit à la même conclusion : la technique DREAM ne semble pas un outil pertinent pour la déorphanisation des OR d'insectes.

- Autres méthodes indirectes de déorphanisation :

Il est possible d'utiliser des approches de génétique inverse pour comprendre le rôle d'un OR donné dans la détection olfactive. Ainsi on peut réduire son expression par interférence ARN ou éliminer le gène correspondant par édition du génome, et suivre les conséquences sur les capacités de détection olfactive des neurones ou sur le comportement de l'insecte. Si la réponse physiologique ou comportementale à un odorant est perturbée, on peut supposer que l'OR altéré joue un rôle important dans la détection de cet odorant.

Parmi ces approches, la technique CRISPR-Cas9 est privilégiée au laboratoire d'une part car l'interférence ARN fonctionne mal chez les lépidoptères (voir synthèse bibliographique) et d'autre part car elle a été mise au point avec succès chez *S. littoralis* et s'avère très efficace. Pour la suite de mes travaux, il pourrait donc être envisageable de l'appliquer pour le knock-out des OR de chenilles non déorphanisés, et suivre en EAG ou en GC-EAD d'éventuelles modifications de réponse. Il serait également pertinent de l'appliquer aux OR déjà déorphanisés, afin de vérifier leur importance dans la reconnaissance des ligands identifiés. En effet, en raison du codage combinatoire, un ligand peut être reconnu par plusieurs OR, ainsi certains OR sont redondants pour la détection d'une même molécule. Si le knock-out d'un OR, ayant pour ligand la molécule X, n'a finalement pas d'effet sur la réponse EAG à X, ou au comportement de l'insecte envers X, alors son rôle dans la reconnaissance de X n'est pas critique.

⇒ ***Apport de la modélisation à l'étude fonctionnelle des OR d'insectes***

Enfin, il est possible d'utiliser des approches in silico pour prédire de possibles ligands des OR. L'approche *"ligand-guidée"*, décrite en détail dans la partie IV de la synthèse bibliographique, a été utilisée au cours de ma thèse sur SlitOR24 et OR25 et s'est avérée très efficace pour trouver de nombreux nouveaux ligands de ces OR (chapitre 4). Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet ANR Demeter, en collaboration avec Jérôme Golebiowski, Sébastien Fiorucci et Cédric Bouysset de l'institut de chimie de Nice. La modélisation a été réalisée en utilisant une approche QSAR, qui permet de comparer les propriétés des ligands connus avec d'autres molécules pour prédire des composés ayant une activité biologique similaire sur le récepteur d'intérêt. Nous avons observé que pour des OR à large spectre, comme SlitOR25 et OR24 qui sont activés par plusieurs molécules, cette approche donne des résultats encourageants. Ainsi, dans un premier temps (chapitre 3), 28% de molécules prédites ont activé le récepteur OR25. Ce pourcentage est proche à ceux obtenus lors des premières études comme celle de Tauxe et al. (2013) qui ont trouvé en moyenne que 30% de toutes les molécules prédites comme actives sur les récepteurs.

Sur la base des premiers résultats obtenus, nous avons effectué une deuxième analyse ligand-ciblée sur SlitOR25 et en ajoutant SlitOR24, en construisant de nouveaux modèles QSAR en utilisant tous les ligands trouvés pour SlitOR25. SlitOR24 a été ajouté car c'est un récepteur avec des caractéristiques similaires à SlitOR25 selon de Fouchier et al. (2018) : non seulement leur spectre de réponse à un panel défini sont similaires (de Fouchier et al. 2017), mais leur activation serait liée à un comportement d'attraction des chenilles vers les ligands (de Fouchier et al. 2018). Les résultats obtenus dans cette deuxième étude ont montré un taux de réussite très élevé, supérieur à 90% des ligands prédits comme étant effectivement actifs sur les ORs ciblés, ce qui démontre la viabilité de ce type d'approche dans l'identification de nouveaux ligands pour les récepteurs avec un spectre large de réponses.

Mais cette technique nécessite de connaître déjà plusieurs ligands de l'OR ciblé, puisqu'elle se base sur la compilation des descripteurs moléculaires communs de ces ligands pour s'en servir pour rechercher d'autres molécules ayant ces mêmes descripteurs. Cette approche présente donc l'inconvénient de ne pas être applicable pour « déorphaniser » un OR au sens strict, mais plutôt pour élargir la liste de ligands obtenus précédemment pour un OR donné (parfois même trouver des ligands plus actifs que ceux déjà connus). Ainsi, l'approche ligand-ciblée ne peut donc pas être envisagée pour les SlitOR orphelins. Ni même pour des OR à spectre étroit. En effet, au début de ma thèse, je me suis focalisé sur l'étude d'un récepteur, SlitOR31, qui possède un spectre étroit de réponse, activé uniquement par l'eugénol (de Fouchier et al. 2017). Une tentative de modélisation ligand-ciblée a été réalisée sur ce récepteur par nos collaborateurs à l'Université de Californie Riverside, États-Unis (A. Ray) et j'ai testé les ligands prédits sur SlitOR31 exprimé en sensille ab3 de drosophile par SSR. Hélas, aucune molécule prédite ne s'est avérée activer SlitOR31(figure 42).

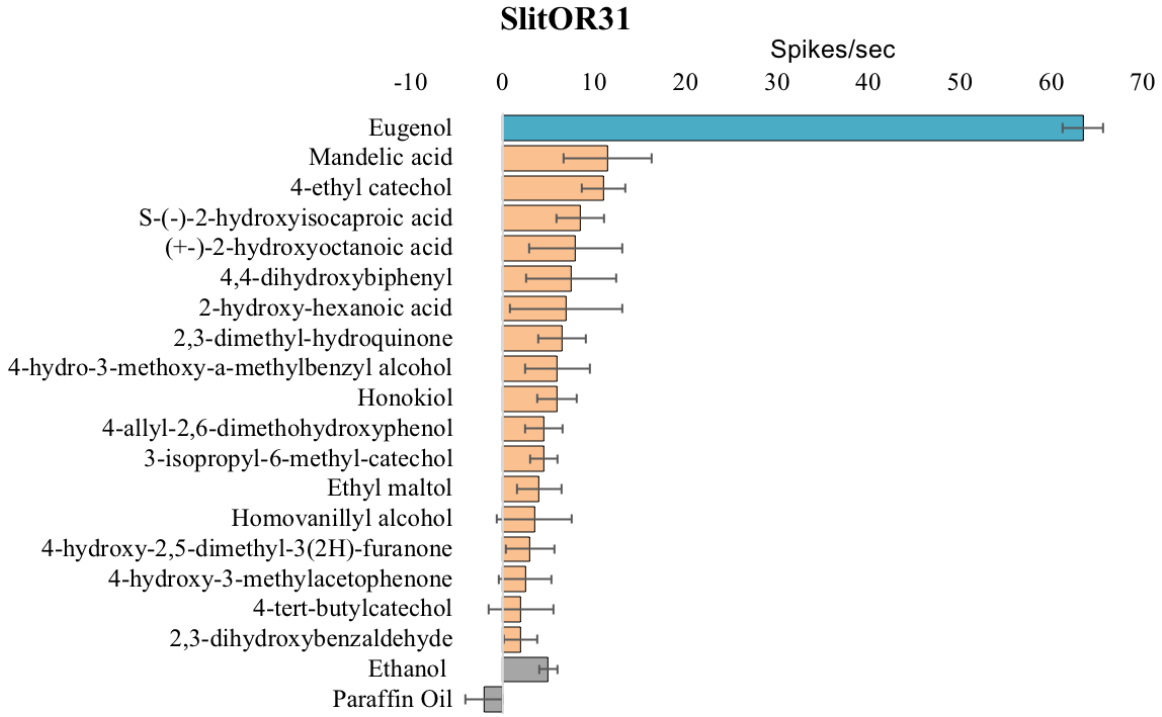


Figure 42. Réponses SSR d'OSN ab3A de drosophile exprimant SlitOR31, à différents ligands potentiels prédits par la modélisation. La barre bleue représente le ligand déjà connu, identifié par de Fouchier et al. (2017). Les barres en orange représentent les molécules prédites par chimie-informatique pour ce récepteur. Les barres en gris représentent les contrôles. Toutes les molécules ont été testées à la dose de 10 µg déposés sur le filtre. n=4.

A partir des résultats obtenus en utilisant la chimie-informatique comme support pour trouver des nouveaux ligands, on peut conclure que l'efficacité de ce système est étroitement liée à la spécificité du récepteur. Ainsi des résultats très prometteurs ont été obtenus pour des récepteurs non-spécifiques, tandis que la même approche n'a pas été concluante pour le récepteur spécifique testé. Les choix de ces récepteurs ont été faits en tenant en compte de l'importance de ces ORs pour les chenilles. SlitOR24 et SlitOR25 sont liés à un comportement attractif (de Fouchier et al. 2018) et SlitOR31 est corrélé avec un comportement répulsif (Rharrabe et al. 2014), et ce dernier est également très exprimé chez les larves.

La prédiction de ligands des récepteurs en utilisant les réponses connues d'autres OR conspécifiques et les similitudes de séquence a été testée récemment dans une étude mené par Chepurwar et al. (2019). Bien que les auteurs n'ont trouvé, comme attendu, aucune corrélation entre la similitude globale des séquences des OR et celle de leur réponse fonctionnelle, cela est cependant possible en se focalisant sur un petit nombre de position dans la séquence. Cette approche peut être utilisée théoriquement même lorsqu'aucun ligand n'est disponible pour l'OR, mais vu le très faible niveau de conservation parmi les OR, cela peut s'avérer compliqué. Cette approche peut être utile pour les récepteurs exprimés dans les neurones qui sont difficiles d'accès dans les expériences d'électrophysiologie ou pour les récepteurs qui ne s'expriment pas correctement dans les systèmes d'expression hétérologues (Chepurwar et al. 2019), mais son efficacité reste limitée.

Enfin, une autre approche " OR-guidée" pourrait s'avérer bien plus prometteuse à l'avenir. Cette approche se base sur l'étude de la structure d'un OR pour y rechercher le site de liaison, ce qui permet de prédire les ligands pouvant s'y loger. La structure d'un OR peut théoriquement être obtenue par l'expérimentation, en produisant la protéine recombinante et en l'analysant par cryo-microscopie électronique. Cette approche est cependant très difficile et seule la structure de l'Orco d'une guêpe a été résolue (Butterwick et al. 2018). L'analyse a révélé une structure tétramérique. De l'extérieur de la cellule, le tétramère Orco ressemble à un moulinet, disposé autour d'un pore central. Dans la même étude, les auteurs proposent qu'une unité réceptrice native dans un neurone olfactif individuel soit un complexe tétramérique d'Orco et d'un OR canonique, probablement composé de deux molécules d'Orco et de deux des ORs.

Bien qu'aucune autre structure que celle d'Orco ne soit à ce jour publiée (en particulier aucune structure d'OR canonique), la découverte de la structure d'Orco a ouvert les portes pour l'étude de la structure d'autres ORs d'insectes. En effet, il est possible de se servir de cette structure pour modéliser tout autre OR, ce qui pourrait être fait dans un avenir proche sur les SlitOR orphelins.

⇒ ***Une idée des ligands à partir de la position phylogénétique des récepteurs ciblés?***

La phylogénie des OR de lépidoptères associés à leur meilleur ligand et publiée en 2017 (de Fouchier et al. 2017) a suggéré une certaine conservation de fonction au sein des clades d'OR. Ainsi il est possible de se servir de cette phylogénie pour avoir une idée des ligands à tester sur un nouvel OR, en se basant sur sa position dans cet arbre. Cependant, les résultats du chapitre 1 apportent le doute sur cette hypothèse. En se basant sur leur position phylogénétique, nous avons observé que les deux récepteurs deorphanisés, nommés SlitOR61 et SlitOR66, sont placés dans le clade des OR aux aromatiques (voir phylogénie OR, chapitre I). Pourtant le ligand qui active le mieux SlitOR61, est un composé non-aromatique, plus précisément un monoterpène, le 1,8-cineole (ou eucalyptol). Cependant on observe dans la phylogénie que la taille de la branche de SlitOR61 est très longue, ce qui pourrait vouloir dire que cet OR est le résultat d'une évolution rapide, ce que la recherche de traces de sélection positive dans la séquence de ce récepteur pourrait confirmer. Ainsi, il pourrait donc s'agir d'une exception au sein du clade des OR aux aromatiques, une sous classe de ce clade ayant pu évoluer vers une autre fonction. Si on prend en compte l'environnement dans lequel se développe la larve de *S. littoralis*, nous trouvons des composés chimiques qui activent ou inhibent des OR, tels que le benzyl alcohol, un composé trouvé dans les fleurs de plusieurs espèces et qui est reconnu comme attractif (Knudsen et al. 2006, de Fouchier et al. 2018) ou des terpènes provenant des excréments larvaires qui ont un effet répulsif (*e.g.* carvacrol, eugenol, nerolidol, etc) (Anderson et al. 1993). D'autres molécules de plantes non hôtes présentes dans l'environnement proche peuvent devenir des nouveaux signaux très importants qui pourraient affecter la façon dont les larves s'orientent et choisissent la nourriture. Les chenilles discriminent parmi des espèces végétales hôtes et non hôtes. Lorsqu'elles ont le choix, elles montrent souvent des préférences marquées qui peuvent cependant être variées selon l'expérience (Schoonhoven and Blom 1988, Salloum et al. 2011). Au cours de ma thèse, le 1,8-cineole, composé trouvé normalement dans des plantes herbacées de la famille des astéracées et certains arbres comme le

pin ou l'eucalyptus, a été identifiée comme molécule qui active fortement le récepteur SlitOR61. Ces plantes ne font pas partie des hôtes des chenilles, et des études sur différentes espèces d'insectes ont démontré l'effet répulsif de la molécule (Scriven and Meloan 1984, Klocke et al. 1987, Maciel et al. 2010, Durden et al. 2011). Des questions se posent alors quant à l'expression d'un récepteur larvaire qui a peut-être évolué rapidement comme conséquence à la cohabitation avec une gamme de plus en plus large de plantes dans l'environnement des chenilles avec des substances potentiellement toxiques, qui pourrait avoir un coût élevé pour l'espèce. L'absence d'études de comportement larvaire envers ce composé nous empêche de conclure objectivement sur l'effet que cette molécule génère chez l'insecte. Mais on peut faire l'hypothèse que SlitOR61 serait apparu en conséquence d'une évolution rapide afin de détecter non seulement des composés aromatiques mais aussi des terpènes potentiellement répulsifs.

Les deux récepteurs les plus proches de SlitOR61 et SlitOR66 dans la phylogénie et pour lesquels des données fonctionnelles sont disponibles sont SlitOR17 et SlitOR31 (Figure 43) (de Fouchier et al. 2017). SlitOR17 est activé par des aromatiques : le méthyl salicylate, le méthyl benzoate et l'acétophénone. Ces trois composées ont été inclus dans le panel d'odorants testés pour les cinq nouveaux récepteurs exprimés en drosophile. Le récepteur SlitOR66 est activé par les mêmes composés que SlitOR17 et présente un spectre de réponse similaire.

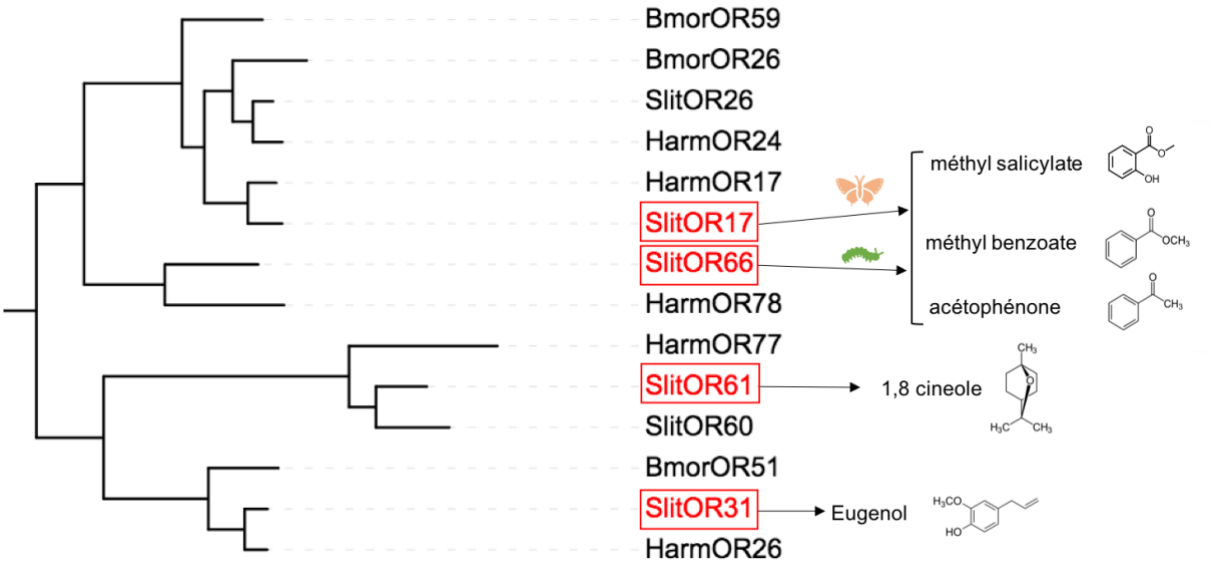


Figure 43. Position phylogénétique des SlitOR dans le clade des OR répondant aux aromatiques. SlitOR61 et SlitOR66, deux nouveaux récepteurs deorphanisés dans le chapitre 1 se positionnent dans ce clade. La position de SlitOR66 est très proche de SlitOR17 dans la phylogénie et ces deux OR sont activés par les mêmes composés aromatiques (de Fouchier et al. 2017). SlitOR61 représente une exception dans ce clade car il est activé principalement par un terpène. Il appartient à un sous clade avec une longue branche. SlitOR31, un récepteur très spécifique à l'eugénol, est indiqué dans la figure. Aucun autre OR étudié ne répond à ce composé.

L'eugénol, ligand de SlitOR31 a été également inclus dans le panel testé, cependant ce composé n'est pas actif pour aucun des deux nouveaux OR proches de SlitOR31 dans l'arbre

phylogénétique. A partir des données fonctionnelles nous avons donc démontré que deux récepteurs, l'un présent chez l'adulte (SlitOR17) et l'autre présent chez la chenille (SlitOR66), répondent aux mêmes composés. Il est important de préciser que SlitOR17 n'est pas exprimé chez la chenille et que SlitOR66 n'a pas été trouvé exprimé chez l'adulte (dans les transcriptomes précédents et en RT-PCR). Il est donc intéressant de voir que dans certains cas les mêmes odeurs sont détectées par des récepteurs différents au stade larvaire et au stade adulte, comme déjà observé chez la drosophile (Kreher et al. 2008). Ceci s'explique bien sûr par le fait que les antennes des chenilles et des papillons sont entièrement différentes, les antennes adultes étant entièrement créées de nouveau à partir des disques imaginaux durant la nymphose (Waku 1991). Dans la plupart des cas, les OR exprimés chez les larves sont aussi exprimés chez les adultes, comme observé par exemple chez *H. armigera* (Di et al. 2017b). Cependant certains OR peuvent être spécifiques d'un stade particulier. Par exemple chez *B. mori* certains OR sont exprimés dans les premiers stades larvaires ou uniquement chez l'adulte (Tanaka et al. 2009). Ceci est peut-être le cas de SlitOR66 et SlitOR17, exprimés chacun dans des stades de développement différents mais capables de détecter les mêmes composés.

5. L'écologie chimique inverse : une approche efficace pour trouver des odorants actifs sur le comportement

L'approche que j'ai utilisée pendant ma thèse permet d'exploiter les informations provenant des gènes pour explorer les réponses neuronales traduites ensuite en un comportement adapté chez la larve. C'est une approche d'écologie chimique inverse, approche en plein essor dans le domaine de l'olfaction. Elle permet, par l'étude des OR dans mon travail (elle peut aussi être appliquée aux OBP par exemple), d'identifier de nouveaux odorants non encore connus comme ayant un rôle dans l'écologie d'une espèce. Elle permet aussi, en travaillant sur un récepteur cible connu comme étant lié à un comportement donné, de faciliter l'identification de nouvelles molécules potentiellement actives pour ce comportement en particulier. De plus, elle permet d'y intégrer des approches de « machine learning » pour la prédiction des ligands. Ainsi, l'identification de molécules actives est beaucoup plus rapide en comparaison aux méthodes de criblages comportementaux classiques, qui nécessitent d'avoir des insectes vivants et en bonne forme et de crible "à l'aveugle" des molécules. Dans mon travail, cette approche d'écologie chimique inverse a permis de mener une approche intégrée combinant les informations provenant des différents niveaux (transcriptome/génome, études électrophysiologiques à un niveau périphérique, chimioinformatique) pour pouvoir les corréler à des réponses comportementales chez les larves. Outre l'identification de molécules actives sur le comportement, cette approche permet également de comprendre les mécanismes sous-jacents à la réponse comportementale, ce que l'étude du comportement seule ne peut pas aborder.

Une fois des ligands d'OR identifiés, plusieurs méthodes sont possibles pour étudier les préférences olfactives des chenilles. Par exemple, des tests de choix réalisés en boîte de Pétri ont été utilisés avec succès dans de nombreuses études de comportement des chenilles (Rharrabe et al. 2014, Di et al. 2017b, de Fouchier et al. 2018). Cette méthode fonctionne bien pour démontrer le choix des chenilles sur des périodes de temps relativement courtes, car les odorants diffusent rapidement dans cet espace clos et l'environnement interne de la boîte peut être très vite saturé

avec les molécules odorantes, donc il peut y avoir des réponses biaisées dû à l'air saturé et l'incapacité des larves de faire un vrai choix dans telles condition. C'est cependant une méthode simple, peu coûteuse et facile à mettre en place. Ce type de dispositif est donc surtout utilisé pour faire des criblages rapides de molécules ainsi que pour observer le premier choix effectué par les chenilles. Le compensateur de locomotion est une autre option pour évaluer le comportement des insectes, et il est particulièrement bien adapté à l'étude des insectes marcheurs, comme les larves de *S. littoralis*. Le grand avantage d'un compensateur de locomotion par rapport à d'autres approches est qu'il permet d'explorer une anémotaxie médiée par des odeurs dans un champ ouvert sans limite de l'arène (Kramer 1976) et permet d'enregistrer des trajectoires et de les décomposer facilement en différents composants (Piesik et al. 2009). Ceci a été déjà utilisé chez les larves des lépidoptères, comme chez *Lobesia botrana* et *Ostrinia nubilalis* pour vérifier les préférences d'orientation vers différentes odeurs (Becher and Guerin 2009, Piesik et al. 2013). Ce système a également été utilisé chez *S. littoralis* pour étudier l'effet de la phéromone sexuelle (Poivet et al. 2012). Cependant il n'est pas adapté pour étudier le choix entre deux stimuli, mais plutôt pour étudier le déplacement dans un espace virtuellement infini, ce qui n'est pas le cas dans les tests en boîte de Pétri.

Dans ma thèse, nous avons décidé d'utiliser un système différent des deux cités précédemment pour des étudier l'effet comportemental des nouveaux ligands identifiés par chimioinformatique. Le système choisi pour les expérimentations de comportement a été celui du tube en Y, qui présente l'avantage de pouvoir déterminer le choix des chenilles entre deux sources odorantes, et sous un flux d'air constant, ce qui évite les saturations par les odeurs en permettant un contrôle de la dispersion des molécules odorantes.

Nous avons mis en place et validé ce dispositif au laboratoire, qui s'est avéré bien fonctionnel pour étudier les préférences des chenilles. Il serait intéressant maintenant de poursuivre en réalisant des études supplémentaires sur différents stades larvaires, afin de vérifier notamment si les comportements observés pour les chenilles L4 sont similaires à ceux des chenilles des premiers stades. Ceci permettrait de déterminer si l'effet attractif est lié au stade larvaire et aux ORs exprimés plus tôt au plus tard dans les larves (voir la discussion sur l'expression des OR dans le chapitre 1), donc à viser un stade particulier qui sera le stade optimal pour l'utilisation des molécules odorantes comme méthode de contrôle des chenilles.

L'approche comportementale a été utilisée ici en se focalisant sur deux récepteurs (SlitOR24 et SlitOR25) pour pouvoir valider d'abord cette nouvelle approche. Cependant, il serait intéressant de vérifier en comportement l'effet des molécules identifiées comme actives pour les nouveaux récepteurs trouvés chez les chenilles et qui ont été deorphanisés dans le chapitre 1 (SlitOR61 et SlitOR66). Les premières informations sur les ligands actifs pour ces OR serviront également à alimenter des modèles de QSAR pour affiner la recherche d'autres molécules actives.

Par ailleurs, les résultats comportementaux obtenus ont confirmé l'efficacité de l'utilisation combinée de la modélisation QSAR et de l'électrophysiologie pour présélectionner des molécules odorantes activant les récepteurs d'intérêt et finalement actives sur le comportement.

Cette approche d'écologie chimique inverse utilisée au cours de ma thèse permet d'accélérer la découverte de molécules actives sur le comportement, car elle sélectionne des molécules potentielles parmi un large éventail de molécules (crible *in silico* de plusieurs milliers de molécules) qui serait bien trop long à tester directement en comportement. A terme, la même

stratégie pourra être utilisée pour cribler d'autres OR de *S. littoralis*, mais pourra également être déclinée sur d'autres espèces nuisibles.
Couplée à l'étude structurale des OR, l'écologie chimique inverse peut être également très efficace pour prédire de nouveaux sémiochimiques à des fins d'utilisation en protection des cultures. En effet, à terme, connaître la structure des OR permettrait par exemple d'identifier les potentiels sites de liaison des molécules pour les différents OR, et par la suite d'identifier des molécules capables d'interagir avec ces sites par des approches pharmacologiques (Carraher et al. 2015). De telles molécules pourraient interférer avec la réponse des OR à leur(s) ligand(s) naturel(s), permettant de manipuler les comportements olfactifs des insectes nuisibles (Luo and Carlson 2018).

Ce type de stratégie structure-ciblée serait une option idéale pour approfondir l'étude des récepteurs chez *S. littoralis* impliqués dans des comportements liés aux ravages des cultures. Par exemple, il serait pertinent de cibler SlitOR5, un récepteur très spécifique au composé majoritaire de la phéromone sexuelle et indispensable à la reproduction (voir article 2 en annexe), ou SlitOR24 et OR25, liés au comportement d'attraction, ou encore les nouveaux OR déorphanisés dans cette thèse (rôle comportemental encore à définir). La connaissance de la structure de la protéine permettrait d'identifier les potentiels sites de liaison au ligand et de dessiner des molécules capables d'interférer avec cette liaison. De plus, si le site de liaison des molécules est similaire pour des OR orthologues d'autres espèces, l'utilisation des molécules sémiochimiques nouvellement dessinées pourraient agir sur un plus large spectre d'espèces.

6. Les OR oui, mais ce ne sont pas les seuls acteurs de la chimioréception des chenilles

Utiliser les OR comme cibles pour rechercher des molécules odorantes actives sur le comportement d'insectes ravageurs comme les chenilles est une stratégie qui semble tout à fait adaptée, car ces molécules constituent un signal indispensable dans l'écologie de l'insecte. Mais en plus des OR, il existe d'autres gènes chimiosensoriels qui participent également à la réception des divers stimuli auxquels les larves sont confrontées dans leur environnement. Il serait donc intéressant d'explorer en détail la fonction de ces éléments (*e.g.* GR, IR, OBP, CSP) pour mieux comprendre leur rôle dans le codage olfactif et gustatif et leur importance dans le déclenchement de comportements clés des larves. Nous avons en effet mis en évidence dans cette thèse (chapitre 1) que les chenilles exprimeraient spécifiquement 2 OBP, ainsi qu'un grand nombre de GR qui n'ont pas encore été mis en évidence comme exprimés chez les adultes. Ils représentent autant d'autres cibles potentielles pour une stratégie d'écologie chimique inverse.

Outre ces acteurs potentiellement spécifiques des chenilles, certains sont partagés avec les adultes mais n'en restent pas moins des cibles privilégiées. Ainsi, Poivet et al. (2012) ont démontré que les chenilles de *S. littoralis* peuvent détecter et être attirées par la phéromone sexuelle de l'adulte, suggérant que les larves pourraient utiliser ce signal pour améliorer la détection de nourriture. En utilisant des techniques d'hybridation *in situ*, ils ont montré que les chenilles expriment des PBP, protéines solubles impliquées dans la détection des phéromones. Jin et al. (2015) ont trouvé une OBP spécifique des larves capables de détecter le composant majoritaire de la phéromone sexuelle chez *S. exigua*. Des études d'hybridation *in situ* sur les larves de *Heliothis virescens* ont montré également la présence des PBP et de SNMP1 avec deux récepteurs aux

phéromones (HR6 et HR13), montrant que les OSN chez les larves et les adultes sont équipés des mêmes éléments moléculaires pour la détection des phéromones sexuelles (Zielonka et al. 2016). D'autres études sur des chenilles de différentes espèces ont confirmé l'expression des gènes nécessaires pour la détection phéromonale (Laue 2000). Ainsi, cibler de tels acteurs de la réception phéromonale pourrait être efficace pour lutter à la fois contre les adultes et les stades larvaires.

Concernant les IR, peu de travaux ont été menés à l'heure actuelle chez les Lépidoptères. Chez les diptères, les IR détectent les molécules odorantes à fonction acide et amine mais aussi la température, l'humidité et les gradients du sel (Ai et al. 2013, Enjin et al. 2016, Hussain et al. 2016, Ni et al. 2016, Jaeger et al. 2018, Raji et al. 2019).

Zhang et al. (2019) se sont focalisés sur le corécepteur IR8a chez *M. sexta,* et ont démontré qu'il était impliqué dans la détection d'acides carboxyliques émis par les excréments des chenilles conspécifiques. Cette détection est suffisante pour dissuader une femelle de pondre sur une plante. IR8a est également exprimé chez la larve de *S. littoralis*, principalement dans l'antenne (chapitre I) et il serait intéressant de vérifier si les excréments des chenilles de cette espèce émettent également des composés acides, et l'effet de ses composées chez les larves conspécifiques. Pour vérifier cela, le knock-out d'IR8a chez les chenilles en utilisant la technique d'édition de gène CRISPR-Cas9 pourrait être envisageable. Jusqu'à maintenant l'étude de l'olfaction a été surtout focalisée sur les OR, mais il serait intéressant d'explorer aussi la fonction des IR chez les larves, afin de mieux comprendre le codage olfactif des chenilles.

Les GR sont probablement très importants pour la sélection d'hôte et le comportement alimentaire des chenilles, puisqu'ils jouent un rôle essentiel chez les insectes dans la détection des sucres, des substances amères, des acides aminés et du CO_2. Cependant, seules des données fragmentaires sont disponibles concernant les études fonctionnelles des GR chez les lépidoptères (Ning et al. 2016), et il n'existe aucune étude pour les chenilles. Il serait donc intéressant d'étudier la fonction des GR chez les larves. Cependant, un inconvénient à l'heure d'étudier les GR est qu'à l'inverse des OR, de nombreux GR sont généralement coexprimés dans un même GRN (*e.g.* plus de 17 GRs dans un GRN chez la larve de drosophile) (Kwon et al. 2011). Cela complique les expériences d'expression hétérologue, puisqu'il peut être nécessaire de coexprimer un grand nombre de GR pour pouvoir identifier les molécules qui les activent. Néanmoins, ces récepteurs restent des cibles de choix pour identifier des molécules utilisables en protection des cultures, notamment à effet anti-appétant.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail a apporté des informations nouvelles sur l'olfaction des chenilles d'un ravageur agricole important et invasif en France, la noctuelle du coton *S. littoralis*. J'ai mobilisé différentes approches qui, combinant la bioinformatique, l'électrophysiologie et l'étude du comportement des insectes, m'ont permis d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires de la détection olfactive au stade larvaire, de découvrir de nouveaux odorants originaux actifs sur le système olfactif de cette espèce, de démontrer l'efficacité de l'approche *in silico* pour accélérer l'identification de nouveaux ligands, et enfin de lier les interactions récepteurs/ligands à un comportement particulier. L'idée à terme est de mobiliser cette approche intégrée pour identifier de nouveaux sémiochimiques utilisables pour le biocontrôle des insectes ravageurs, en perturbant leur odorat.

Mais ce travail ouvre d'autres perspectives dans le domaine de la protection des cultures et au-delà, puisque les récepteurs olfactifs des insectes sont aujourd'hui considérés comme de possibles outils de détection bioélectronique de molécules volatiles. En effet, l'idée germe aujourd'hui de pouvoir les greffer sur des biosenseurs ou nez électroniques bio-inspirés (Bohbot and Vernick 2020). Si des prototypes utilisent déjà les OBP avec un certain succès, la possibilité d'utiliser les OR ouvre de nouvelles perspectives, car ces récepteurs sont plus sensibles et souvent bien plus spécifiques que les OBP. De tels biosenseurs à base d'OR permettraient par exemple la détection précoce de l'arrivée de nouveaux ravageurs en détectant les premières phéromones présentes dans l'environnement, ou les premiers HIPV (« Herbivore-induced plant volatiles ») de plantes attaquées. Mais leur utilisation pourrait aller bien au-delà de la protection des cultures, puisque les OR des insectes sont capables de détecter un panel de molécules qu'ils ne rencontrent pas naturellement dans leur environnement, comme démontré dans le chapitre 3 où SlitOR25 détecte avec efficacité tout un panel de molécules fluorées. Par exemple, certains OR de drosophile ont été montrés comme capables de discriminer des arômes du vin ou de détecter des produits chimiques industriels volatils (substances toxiques, substances explosives) (Nowotny et al. 2014). Les applications sont donc ouvertes dans tous les domaines, l'agroalimentaire, la cosmétique, la sécurité, l'environnement ou la médecine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abuin, L., B. Bargeton, M. H. Ulbrich, E. Y. Isacoff, S. Kellenberger, and R. Benton. 2011. Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. Neuron 69:44–60.

Adams, M. D. 2000. The Genome Sequence of Drosophila melanogaster. Science 287:2185–2195.

Ai, M., S. Blais, J.-Y. Park, S. Min, T. A. Neubert, and G. S. B. Suh. 2013. Ionotropic Glutamate Receptors IR64a and IR8a Form a Functional Odorant Receptor Complex In Vivo in Drosophila. Journal of Neuroscience 33:10741–10749.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403–410.

Anderson, P., and J. Agrell. 2005. Within-plant variation in induced defence in developing leaves of cotton plants. Oecologia 144:427–434.

Anderson, P., E. Hallberg, and M. Subchev. 2000. Morphology of antennal sensilla auricillica and their detection of plant volatiles in the Herald moth, Scoliopteryx libatrix L. (Lepidoptera: Noctuidae). Arthropod Structure and Development 29:33–41.

Anderson, P., B. S. Hansson, and J. Löfqvist. 1995. Plant-odour-specific receptor neurones on the antennae of female and male Spodoptera littoralis. Physiological Entomology 20:189–198.

Anderson, P., M. Hilker, B. S. Hansson, S. Bombosch, B. Klein, and H. Schildknecht. 1993. Oviposition deterring components in larval frass of Spodoptera littoralis (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae): A behavioural and electrophysiological evaluation. Journal of Insect Physiology 39:129–137.

Anderson, P., M. M. Sadek, M. Larsson, B. S. Hansson, and G. Thöming. 2013. Larval host plant experience modulates both mate finding and oviposition choice in a moth. Animal Behaviour 85:1169–1175.

Andersson, M. N., C. Löfstedt, and R. D. Newcomb. 2015. Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. Frontiers in Ecology and Evolution 3.

Ansebo, L., R. Ignell, J. Löfqvist, and B. S. Hansson. 2005. Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Insect Physiology 51:1066–1074.

Anton, S., and U. Homberg. 1999. Antennal Lobe Structure. Pages 97–124 Insect Olfaction.

Apweiler, R., A. Bairoch, L. Bougueleret, S. Altairac, V. Amendolia, A. Auchincloss, G. Argoud-Puy, K. Axelsen, D. Baratin, M. C. Blatter, B. Boeckmann, J. Bolleman, L. Bollondi, E. Boutet, S. B. Quintaje, L. Breuza, A. Bridge, E. DeCastro, L. Ciapina, D. Coral, E. Coudert, I. Cusin, G. Delbard, D. Dornevil, P. D. Roggli, S. Duvaud, A. Estreicher, L. Famiglietti, M. Feuermann, S. Gehant, N. Farriol-Mathis, S. Serenella Ferro, E. Gasteiger, A. Gateau, V. Gerritsen, A. Gos, N. Gruaz-Gumowski, U. Hinz, C. Hulo, N. Hulo, J. James, S. Jimenez, F. Jungo, V. Junker, T. Kappler, G. Keller, C. Lachaize, L. Lane-Guermonprez, P. Langendijk-Genevaux, V. Lara, P. Lemercier, V. Le Saux, D. Lieberherr, T. de Oliveira Lima, V. Mangold, X. Martin, P. Masson, K. Michoud, M. Moinat, A. Morgat, A. Mottaz, S. Paesano, I. Pedruzzi, I. Phan, S. Pilbout, V. Pillet, S. Poux, M. Pozzato, N. Redaschi, S. Reynaud, C. Rivoire, B. Roechert, M. Schneider, C. Sigrist, K. Sonesson, S. Staehli, A.

Stutz, S. Sundaram, M. Tognolli, L. Verbregue, A. L. Veuthey, L. Yip, L. Luiz Zuletta, R. Apweiler, Y. Alam-Faruque, R. Antunes, D. Barrell, D. Binns, L. Bower, P. Browne, C. Wei Mun, E. Dimmer, R. Eberhardt, A. Fedotov, R. Foulger, J. Garavelli, R. Golin, A. Horne, R. Huntley, J. Jacobsen, M. Kleen, P. Kersey, K. Laiho, R. Leinonen, D. Legge, Q. Lin, M. Magrane, M. J. Martin, C. O'Donovan, S. Orchard, J. O'Rourke, S. Patient, M. Pruess, A. Sitnov, E. Stanley, M. Corbett, G. di Martino, M. Donnelly, J. Luo, P. van Rensburg, C. Wu, C. Arighi, L. Arminski, W. Barker, Y. Chen, Z. Z. Hu, H. K. Hua, H. Huang, R. Mazumder, P. McGarvey, D. A. Natale, A. Nikolskaya, N. Petrova, B. E. Suzek, S. Vasudevan, C. R. Vinayaka, L. Su Yeh, and J. Zhang. 2009. The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. Nucleic Acids Research 37:D169–D174.

Aryan, A., M. A. E. Anderson, K. M. Myles, and Z. N. Adelman. 2013. TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector Aedes aegypti. PLoS ONE 8.

Balkenius, A., W. Rosén, and A. Kelber. 2006. The relative importance of olfaction and vision in a diurnal and a nocturnal hawkmoth. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 192:431–437.

Barclay, H., and P. Van Den Driessche. 1983. Pheromone trapping models for insect pest control. Researches on population Ecology 25:105–115.

Bastin-Héline, L., A. de Fouchier, S. Cao, F. Koutroumpa, G. Caballero-Vidal, S. Robakiewicz, C. Monsempes, M.-C. François, T. Ribeyre, A. Maria, T. Chertemps, A. de Cian, W. B. Walker, G. Wang, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2019. A novel lineage of candidate pheromone receptors for sex communication in moths. eLife 8:707174.

Becher, P. G., and P. M. Guerin. 2009. Oriented responses of grapevine moth larvae Lobesia botrana to volatiles from host plants and an artificial diet on a locomotion compensator. Journal of Insect Physiology 55:384–393.

Bell, J. S., and R. I. Wilson. 2016. Behavior Reveals Selective Summation and Max Pooling among Olfactory Processing Channels. Neuron 91:425–438.

de Belle, J., and M. Heisenberg. 1994. Associative odor learning in Drosophila abolished by chemical ablation of mushroom bodies. Science 263:692–695.

Benton, R. 2015. Multigene Family Evolution: Perspectives from Insect Chemoreceptors. Trends in Ecology & Evolution 30:590–600.

Benton, R., S. Sachse, S. W. Michnick, and L. B. Vosshall. 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. PLoS Biology 4:240–257.

Benton, R., K. S. Vannice, C. Gomez-Diaz, and L. B. Vosshall. 2009. Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in Drosophila. Cell 136:149–162.

Benton, R., K. S. Vannice, and L. B. Vosshall. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in Drosophila. Nature 450:289–293.

Bernier, U. R., D. L. Kline, D. R. Barnard, C. E. Schreck, and R. A. Yost. 2000. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (Aedes aegypti). Analytical Chemistry 72:747–756.

Bibikova, M., M. Golic, K. G. Golic, and D. Carroll. 2002. Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-Finger Nucleases. Genetics 161:1169 LP – 1175.

Binyameen, M., P. Anderson, R. Ignell, G. Birgersson, M. Razaq, S. A. Shad, B. S. Hansson, and

F. Schlyter. 2014. Identification of Plant Semiochemicals and Characterization of New Olfactory Sensory Neuron Types in a Polyphagous Pest Moth , Spodoptera littoralis:719–733.

Binyameen, M., P. Anderson, R. Ignell, M. A. Seada, M. Planck, and C. Ecology. 2012. Spatial Organization of Antennal Olfactory Sensory Neurons in the Female Spodoptera littoralis Moth : Differences in Sensitivity and Temporal Characteristics:613–629.

Blackman, R. ., and V. . Eastop. 2000. Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide. Second.

Blankenberg, D., A. Gordon, G. Von Kuster, N. Coraor, J. Taylor, A. Nekrutenko, and G. Team. 2010. Manipulation of FASTQ data with galaxy. Bioinformatics 26:1783–1785.

Bohbot, J. D., and S. Vernick. 2020. The Emergence of Insect Odorant Receptor-Based Biosensors. Biosensors 10:26.

Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114–2120.

Borrero-Echeverry, F., P. G. Becher, G. Birgersson, M. Bengtsson, P. Witzgall, and A. M. Saveer. 2015. Flight attraction of Spodoptera littoralis (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. Frontiers in Ecology and Evolution 3:1–7.

Bouchard, Y., and C. Cloutier. 1984. Honeydew as a source of host-searching kairomones for the aphid parasitoid Aphidius nigripes (Hymenoptera: Aphidiidae) . Canadian Journal of Zoology 62:1513–1520.

Boyle, S. M., T. Guda, C. K. Pham, S. K. Tharadra, A. Dahanukar, and A. Ray. 2016. Natural DEET substitutes that are strong olfactory repellents of mosquitoes and flies. bioRxiv:060178.

Boyle, S. M., S. Mcinally, and A. Ray. 2013. Expanding the olfactory code by in silico decoding of odor-receptor chemical space:1–17.

Bradley, T. J., A. D. Briscoe, S. G. Brady, H. L. Contreras, B. N. Danforth, R. Dudley, D. Grimaldi, J. F. Harrison, J. A. Kaiser, C. Merlin, S. M. Reppert, J. M. VandenBrooks, and S. P. Yanoviak. 2009. Episodes in insect evolution. Integrative and Comparative Biology 49:590–606.

Brand, A. H., and N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118:401–415.

Brand, P., H. M. Robertson, W. Lin, R. Pothula, W. E. Klingeman, J. L. Jurat-Fuentes, and B. R. Johnson. 2018. The origin of the odorant receptor gene family in insects. eLife 7:1–13.

Bray, S., and H. Amrein. 2003. A putative Drosophila pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. Neuron 39:1019–1029.

Brown, E. S., and C. F. Dewhurst. 1975. The genus spodoptera (Lepidoptera, Noctuidae) in Africa and the Near East. Bulletin of Entomological Research 65:221–262.

De Bruyne, M., and T. C. Baker. 2008. Odor detection in insects: Volatile codes. Journal of Chemical Ecology 34:882–897.

de Bruyne, M., P. J. Clyne, and J. R. Carlson. 1999. Odor coding in a model olfactory organ: the Drosophila maxillary palp. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19:4520–32.

De Bruyne, M., K. Foster, and J. R. Carlson. 2001. Odor coding in the Drosophila antenna.

Neuron 30:537–552.
Buck, L., and R. Axel. 1991. A Novel Multigene Family May Encode Odrant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. Cell 65:175–187.
Bushdid, C., M. O. Magnasco, L. B. Vosshall, and A. Keller. 2014. Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli. Science 343:1370–1372.
Bushdid, C., C. A. De March, S. Fiorucci, H. Matsunami, and J. Golebiowski. 2018. Agonists of G-Protein-Coupled Odorant Receptors Are Predicted from Chemical Features. Journal of Physical Chemistry Letters 9:2235–2240.
Butterwick, J. A., J. del Mármol, K. H. Kim, M. A. Kahlson, J. A. Rogow, T. Walz, and V. Ruta. 2018a. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. Nature 560:447–452.
Butterwick, J. A., J. del Mármol, K. H. Kim, M. A. Kahlson, J. A. Rogow, T. Walz, and V. Ruta. 2018b. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. Nature 560:447–452.
Caballero-Vidal, G., C. Bouysset, H. Grunig, S. Fiorucci, N. Montagné, J. Golebiowski, and E. Jacquin-Joly. 2020. Machine learning decodes chemical features to identify novel agonists of a moth odorant receptor. Scientific Reports 10:1655.
Calatayud, P.-A., F. Marion-Poll, and D. Thiéry. 2013. La réception sensorielle chez les insectes. Pages 137–149 Interactions insectes-plantes. quae.
Campanacci, V., A. Lartigue, B. M. Hällberg, T. A. Jones, M. T. Giudici-Orticoni, M. Tegoni, and C. Cambillau. 2003. Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:5069–5074.
Campion, D. G., P. Hunter-Jones, L. J. McVeigh, D. R. Hall, R. Lester, and B. F. Nesbitt. 1980. Modification of the attractiveness of the primary pheromone component of the Egyptian cotton leafworm, Spodoptera littoralis (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), by secondary pheromone components and related chemicals. Bulletin of Entomological Research 70:417–434.
Cardé, R., and J. Millar. 2009. Pheromones. Pages 766–772 Encyclopedia of insects. Second edi.
Cardé, R. T., and M. A. Willis. 2008. Navigational strategies used by insects to find distant, wind-borne sources of odor. Journal of Chemical Ecology 34:854–866.
Carey, A. F., and J. R. Carlson. 2011. Insect olfaction from model systems to disease control. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:12987–12995.
Carey, A. F., G. Wang, C. Y. Su, L. J. Zwiebel, and J. R. Carlson. 2010. Odorant reception in the malaria mosquito Anopheles gambiae. Nature 464:66–71.
Carlson, J. R. 1996. Olfaction in Drosophila: From odor to behavior. Trends in Genetics 12:175–180.
Carlsson, M. A., C. G. Galizia, and B. S. Hansson. 2002. Spatial Representation of Odours in the Antennal Lobe of the Moth Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). Chemical Senses 27:231–244.
Carraher, C., J. Dalziel, M. D. Jordan, D. L. Christie, R. D. Newcomb, and A. V. Kralicek. 2015. Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 66:31–41.
Carroll, D. 2011. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. Genetics 188:773–782.
Carroll, D. 2014. Genome Engineering with Targetable Nucleases. Annual Review of

Biochemistry 83:409–439.
Carroll, M. J., E. A. Schmelz, R. L. Meagher, and P. E. A. Teal. 2006. Attraction of Spodoptera frugiperda larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. Journal of Chemical Ecology 32:1911–1924.
Cattaneo, A. M., F. Gonzalez, J. M. Bengtsson, E. A. Corey, E. Jacquin-Joly, N. Montagné, U. Salvagnin, W. B. Walker, P. Witzgall, G. Anfora, and Y. V. Bobkov. 2017. Candidate pheromone receptors of codling moth Cydia pomonella respond to pheromones and kairomones. Scientific Reports 7:41105.
Chahda, J. S., N. Soni, J. S. Sun, S. A. M. Ebrahim, B. L. Weiss, and J. R. Carlson. 2019. The molecular and cellular basis of olfactory response to tsetse fly attractants. PLoS Genetics:1–22.
Cheng, T., J. Wu, Y. Wu, R. V. Chilukuri, L. Huang, K. Yamamoto, L. Feng, W. Li, Z. Chen, H. Guo, J. Liu, S. Li, X. Wang, L. Peng, D. Liu, Y. Guo, B. Fu, Z. Li, C. Liu, Y. Chen, A. Tomar, F. Hilliou, N. Montagné, E. Jacquin-Joly, E. D'Alençon, R. K. Seth, R. K. Bhatnagar, A. Jouraku, T. Shiotsuki, K. Kadono-Okuda, A. Promboon, G. Smagghe, K. P. Arunkumar, H. Kishino, M. R. Goldsmith, Q. Feng, Q. Xia, and K. Mita. 2017. Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. Nature Ecology and Evolution 1:1747–1756.
Chepurwar, S., A. Gupta, R. Haddad, and N. Gupta. 2019. Sequence-based prediction of olfactory receptor responses. Chemical Senses 44:693–703.
Cherkasov, A., E. N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I. I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y. C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V. E. Kuz'Min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloth, J. Gasteiger, A. Richard, and A. Tropsha. 2014. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? Journal of Medicinal Chemistry 57:4977–5010.
Chin, S. G., S. E. Maguire, P. Huoviala, G. S. X. E. Jefferis, and C. J. Potter. 2018. Olfactory Neurons and Brain Centers Directing Oviposition Decisions in Drosophila. Cell Reports 24:1667–1678.
Choe, D. H., H. Park, C. Vo, and A. Knyshov. 2016. Chemically mediated arrestment of the bed bug, Cimex lectularius, by volatiles associated with exuviae of conspecifics. PLoS ONE 11:1–14.
Chou, Y. H., M. L. Spletter, E. Yaksi, J. C. S. Leong, R. I. Wilson, and L. Luo. 2010. Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the Drosophila antennal lobe. Nature Neuroscience 13:439–449.
Clavijo Mccormick, A., J. Gershenzon, and S. B. Unsicker. 2014. Little peaks with big effects: Establishing the role of minor plant volatiles in plant-insect interactions. Plant, Cell and Environment 37:1836–1844.
Clavijo McCormick, A., E. Grosse-Wilde, D. Wheeler, M. C. Mescher, B. S. Hansson, and C. M. De Moraes. 2017. Comparing the Expression of Olfaction-Related Genes in Gypsy Moth (Lymantria dispar) Adult Females and Larvae from One Flightless and Two Flight-Capable Populations. Frontiers in Ecology and Evolution 5:1–19.
Clyne, P., A. Grant, R. O'Connell, and J. R. Carlson. 1997. Odorant response of individual sensilla on the Drosophila antenna. Invertebrate Neuroscience 3:127–135.

Clyne, P. J., C. G. Warr, M. R. Freeman, D. Lessing, J. Kim, and J. R. Carlson. 1999. A Novel Family of Divergent Seven-Transmembrane Proteins. Neuron 22:327–338.

Corcoran, J. A., M. D. Jordan, C. Carraher, and R. D. Newcomb. 2014. A novel method to study insect olfactory receptor function using HEK293cells. Insect Biochemistry and Molecular Biology 54:22–32.

Cornford, M. E., W. A. Rowley, and J. A. Klun. 1973. Scanning Electron Microscopy of Antennal Sensilla of the European Corn Borer, Ostrinia nubilalis1. Annals of the Entomological Society of America 66:1079–1088.

Couto, A., M. Alenius, and B. J. Dickson. 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the Drosophila olfactory system. Current Biology 15:1535–1547.

Couton, L., S. Minoli, K. Kiêu, S. Anton, and J. P. Rospars. 2009. Constancy and variability of identified glomeruli in antennal lobes: Computational approach in Spodoptera littoralis. Cell and Tissue Research 337:491–511.

Couzin, J. 2002. BREAKTHROUGH OF THE YEAR: Small RNAs Make Big Splash. Science 298:2296–2297.

Croset, V., R. Rytz, S. F. Cummins, A. Budd, D. Brawand, H. Kaessmann, T. J. Gibson, and R. Benton. 2010. Ancient Protostome Origin of Chemosensory Ionotropic Glutamate Receptors and the Evolution of Insect Taste and Olfaction. PLoS Genetics 6:e1001064.

Cuthill, I. C., J. C. Partridge, A. T. D. Bennett, S. C. Church, N. S. Hart, and S. Hunt. 2000. Ultraviolet Vision in Birds. Advances in the Study of Behavior 29:159–214.

Dahanukar, A., K. Foster, W. M. Van der Goes van Naters, and J. R. Carlson. 2001. A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of Drosophila. Nature Neuroscience 4:1182–1186.

Dasmahapatra, K. K., J. R. Walters, A. D. Briscoe, J. W. Davey, A. Whibley, N. J. Nadeau, A. V. Zimin, C. Salazar, L. C. Ferguson, S. H. Martin, J. J. Lewis, S. Adler, S. J. Ahn, D. A. Baker, S. W. Baxter, N. L. Chamberlain, C. Ritika, B. A. Counterman, T. Dalmay, L. E. Gilbert, K. Gordon, D. G. Heckel, H. M. Hines, K. J. Hoff, P. W. H. Holland, E. Jacquin-Joly, F. M. Jiggins, R. T. Jones, D. D. Kapan, P. Kersey, G. Lamas, D. Lawson, D. Mapleson, L. S. Maroja, A. Martin, S. Moxon, W. J. Palmer, R. Papa, A. Papanicolaou, Y. ick Pauchet, D. A. Ray, N. Rosser, S. L. Salzberg, M. A. Supple, A. Surridge, A. Tenger-Trolander, H. Vogel, P. A. Wilkinson, D. Wilson, J. A. Yorke, F. Yuan, A. L. Balmuth, C. Eland, K. Gharbi, M. Thomson, R. A. Gibbs, Y. Han, J. C. Jayaseelan, C. Kovar, T. Mathew, D. M. Muzny, F. Ongeri, L. L. Pu, J. Qu, R. L. Thornton, K. C. Worley, Y. Q. Wu, M. Linares, M. L. Blaxter, R. H. ffrench-Constant, M. Joron, M. R. Kronforst, S. P. Mullen, R. D. Reed, S. E. Scherer, S. Richards, J. Mallet, W. O. Mc Millan, and C. D. Jiggins. 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. Nature 487:94–98.

Datta, S. R., M. L. Vasconcelos, V. Ruta, S. Luo, A. Wong, E. Demir, J. Flores, K. Balonze, B. J. Dickson, and R. Axel. 2008. The Drosophila pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit. Nature 452:473–477.

David, C. T., J. S. Kennedy, and A. R. Ludlow. 1983. Finding of a sex pheromone source by gypsy moths released in the field. Nature 303:804–806.

Davies, K. T. J., I. Maryanto, and S. J. Rossiter. 2013. Evolutionary origins of ultrasonic hearing

and laryngeal echolocation in bats inferred from morphological analyses of the inner ear. Frontiers in Zoology 10:1.

Davis, R. L. 2005. Olfactory memory formation in Drosophila : From Molecular to Systems Neuroscience. Annual Review of Neuroscience 28:275–302.

Degennaro, M., C. S. McBride, L. Seeholzer, T. Nakagawa, E. J. Dennis, C. Goldman, N. Jasinskiene, A. A. James, and L. B. Vosshall. 2013. Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. Nature 498:487–491.

Dethier, V. ., and L. M. Schoonhoven. 1969. Olfactory coding by lepidopterous larvae. Entomologia Experimentalis et Applicata 12:535–543.

Di, C., C. Ning, L. Huang, and C. Wang. 2017. Design of larval chemical attractants based on odorant response spectra of odorant receptors in the cotton bollworm. Insect Biochemistry and Molecular Biology 84:48–62.

Dobritsa, A. A., W. van der Goes van Naters, C. G. Warr, R. A. Steinbrecht, and J. R. Carlson. 2003. Integrating the Molecular and Cellular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Neuron 37:827–841.

Drijfhout, F., R. Kather, and S. Martin. 2009. The role of cuticular hydrocarbons in insects. Pages 91–114 Behavioral and Chemical Ecology. Nova Science Publishers, Inc.

Du, Y., G. M. Poppy, W. Powell, and L. J. Wadhams. 1997. Chemically mediated associative learning in the host foraging behavior of the aphid parasitoid Aphidius ervi (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Insect Behavior 10:509–522.

Dudareva, N., E. Pichersky, and J. Gershenzon. 2009. Update on Biochemistry of Plant Volatiles. Plant physiology 135:1893–1902.

Duistermars, B. J., and M. A. Frye. 2010. Multisensory integration for odor tracking by flying Drosophila. Behavior, circuits and speculation. Communicative and Integrative Biology 3:1–5.

Dunkelblum, E., M. Kehat, S. Gothilf, S. Greenberg, and B. Sklarsz. 1982. Optimized mixture of sex pheromonal components for trapping of male Spodoptera littoralis in Israel. Phytoparasitica 10.

Dunkelblum, E., M. Kehat, M. Harel, and D. Gordon. 1987. Sexual behaviour and pheromone titre of the Spodoptera littoralis female moth. Entomologia Experimentalis et Applicata 44:241–247.

Durand, N., G. Carot-Sans, F. Bozzolan, G. Rosell, D. Siaussat, S. Debernard, T. Chertemps, and M. Maïbèche-Coisne. 2011. Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, spodoptera littoralis. PLoS ONE 6:1–7.

Durand, N., G. Carot-Sans, T. Chertemps, N. Montagné, E. Jacquin-Joly, S. Debernard, and M. Maïbèche-Coisne. 2010. A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth Spodoptera littoralis. Insect Molecular Biology 19:87–97.

Durden, K., S. Sellars, B. Cowell, J. J. Brown, and M. A. Pszczolkowski. 2011. Artemisia annua extracts, artemisinin and 1,8-cineole, prevent fruit infestation by a major, cosmopolitan pest of apples. Pharmaceutical Biology 49:563–568.

Dweck, H. K. M., S. A. M. Ebrahim, S. Kromann, D. Bown, Y. Hillbur, S. Sachse, B. S. Hansson, and M. C. Stensmyr. 2013. Olfactory preference for egg laying on citrus substrates

in Drosophila. Current Biology 23:2472–2480.
Eacock, A., H. M. Rowland, A. E. van't Hof, C. J. Yung, N. Edmonds, and I. J. Saccheri. 2019. Adaptive colour change and background choice behaviour in peppered moth caterpillars is mediated by extraocular photoreception. Communications Biology 2:1–8.
Ebbinghaus, D., P. M. Lösel, M. Lindemann, J. Scherkenbeck, and C. P. W. Zebitz. 1997. Detection of major and minor sex pheromone components by the male codling moth Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Insect Physiology 44:49–58.
Elghar, G. E. A., Z. A. Elbermawy, A. G. Yousef, and H. K. A. Elhady. 2005. Monitoring and Characterization of Insecticide Resistance in the Cotton Leafworm, Spodoptera littoral is (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Asia-Pacific Entomology 8:397–410.
Ellis, S. E. 2004. New Pest Response Guidelines: Spodoptera. USDA/APHIS/PPQ/PDMP. http://www.aphis.usda.gov/ppq/manuals/.
Elmore, T., R. Ignell, J. R. Carlson, and D. P. Smith. 2003. Targeted Mutation of a Drosophila Odor Receptor Defines Receptor Requirement in a Novel Class of Sensillum. Journal of Neuroscience 23:9906–9912.
Engsontia, P., U. Sangket, W. Chotigeat, and C. Satasook. 2014. Molecular evolution of the odorant and gustatory receptor genes in lepidopteran insects: Implications for their adaptation and speciation. Journal of Molecular Evolution 79:21–39.
Enjin, A., E. E. Zaharieva, D. D. Frank, S. Mansourian, G. S. B. Suh, M. Gallio, and M. C. Stensmyr. 2016. Humidity sensing in drosophila. Current Biology 26:1352–1358.
EPPO (European Plant Protection Organisation). 2019. EPPO global data base: Spodoptera littoralis. https://gd.eppo.int/taxon/SPODLI/distribution.
European Food Safety Authority. 2015. Scientific Opinion on the pest categorisation of Spodoptera littoralis. Page EFSA Journal.
Eyun, S. Il, H. Y. Soh, M. Posavi, J. B. Munro, D. S. T. Hughes, S. C. Murali, J. Qu, S. Dugan, S. L. Lee, H. Chao, H. Dinh, Y. Han, H. V. Doddapaneni, K. C. Worley, D. M. Muzny, E. O. Park, J. C. Silva, R. A. Gibbs, S. Richards, and C. E. Lee. 2017. Evolutionary history of chemosensory-related gene families across the arthropoda. Molecular Biology and Evolution 34:1838–1862.
Fandino, R. A., A. Haverkamp, S. Bisch-Knaden, J. Zhang, S. Bucks, T. A. N. Thi, A. Werckenthin, J. Ryback, M. Stengl, M. Knaden, B. S. Hansson, and E. Grosse-Wilde. 2019. Mutagenesis of orco impairs foraging but not oviposition in the hawkmoth Manduca sexta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116:15677–15685.
FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. Briefing note on FAO actions on fall armyworm.
Faucheux, M. J. 1985. Morphology and distribution of antennal sensilla in the female and male clothes moth, Tineola bisselliella Humm. (Lepidoptera: Tineidae). Canadian Journal of Zoology 63:355–362.
Faucheux, M. J. 2006. Antennal sensilla of male Lophocorona pediasia Common 1973 and their phylogenetic implications (Lepidoptera: Lophocoronidae). Annales de la Société entomologique de France (N.S.) 42:113–118.
Ferveur, J.-F. 1997. The pheromonal role of cuticular hydrocarbons inDrosophila melanogaster.

BioEssays 19:353–358.
Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391:806–811.
Fishilevich, E., A. I. Domingos, K. Asahina, F. Naef, L. B. Vosshall, and M. Louis. 2005. Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in Drosophila. Current Biology 15:2086–2096.
Fleischer, J., P. Pregitzer, H. Breer, and J. Krieger. 2017. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. Cellular and Molecular Life Sciences.
Fleischer, J., P. Pregitzer, H. Breer, and J. Krieger. 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. Cellular and Molecular Life Sciences 75:485–508.
Forstner, M., H. Breer, and J. Krieger. 2009. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth Antheraea polyphemus. International Journal of Biological Sciences 5:745–757.
Forstner, M., T. Gohl, I. Gondesen, K. Raming, H. Breer, and J. Krieger. 2008. Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. Chemical Senses 33:291–299.
de Fouchier, A., N. Montagné, O. Mirabeau, and E. Jacquin-Joly. 2014. Current views on the function and evolution of olfactory receptors in Lepidoptera. Pages 385–408 Short views on Insect Biochemistry and Molecular Biology.
de Fouchier, A., X. Sun, G. Caballero-Vidal, S. Travaillard, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2018. Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant Receptors. Frontiers in Behavioral Neuroscience 12:264.
de Fouchier, A., X. Sun, C. Monsempes, O. Mirabeau, E. Jacquin-Joly, and N. Montagné. 2015. Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus Spodoptera. Frontiers in Ecology and Evolution 3:1–11.
de Fouchier, A., W. B. Walker, N. Montagné, C. Steiner, M. Binyameen, F. Schlyter, T. Chertemps, A. Maria, M.-C. François, C. Monsempes, P. Anderson, B. S. Hansson, M. C. Larsson, and E. Jacquin-Joly. 2017. Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. Page 15709 Nature Communications.
Fox, A. N., R. J. Pitts, H. M. Robertson, J. R. Carlson, and L. J. Zwiebel. 2001. Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito Anopheles gambiae and evidence of down-regulation in response to blood feeding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:14693–14697.
Friedrich, R. W., and G. Laurent. 2001. Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. Science 291:889–894.
Fu, L., B. Niu, Z. Zhu, S. Wu, and W. Li. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics 28:3150–3152.
Galizia, C. G., and S. Sachse. 2010. Odor coding in insects. Page The neurobiology of olfaction. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
Ganguly, A., L. Pang, V. K. Duong, A. Lee, H. Schoniger, E. Varady, and A. Dahanukar. 2017.

A Molecular and Cellular Context-Dependent Role for Ir76b in Detection of Amino Acid Taste. Cell Reports 18:737–750.

Ganiger, P. C., H. M. Yeshwanth, K. Muralimohan, N. Vinay, A. R. V. Kumar, and K. Chandrashekara. 2018. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. Current Science 115:621–623.

Gao, Q., and A. Chess. 1999. Identification of candidate Drosophila olfactory receptors from genomic DNA sequence. Genomics 60:31–39.

García-Valverde, M., and T. Torroba. 2005. Sulfur-Nitrogen Heterocycles. Molecules 10:318–320.

Geppert, H., M. Vogt, and J. Bajorath. 2010. Current Trends in Ligand-Based Virtual Screening: Molecular Representations, Data Mining Methods, New Application Areas, and Performance Evaluation. Journal of Chemical Information and Modeling 50:205–216.

Getahun, M. N., D. Wicher, B. S. Hansson, and S. B. Olsson. 2012. Temporal response dynamics of Drosophila olfactory sensory neurons depends on receptor type and response polarity. Frontiers in Cellular Neuroscience 6:1–11.

Gibbs, A. G., and E. L. Crockett. 1998. The biology of lipids: integrative and comparative perspectives. American Zoologist 38:265–267.

van Giesen, L., and P. A. Garrity. 2017. More than meets the IR: the expanding roles of variant Ionotropic Glutamate Receptors in sensing odor, taste, temperature and moisture. F1000Research 6:1753.

Ginzel, M. D. 2010. Olfactory Signals. Pages 584–588 Encyclopedia of Animal Behavior. Elsevier.

Goecks, J., A. Nekrutenko, J. Taylor, E. Afgan, G. Ananda, D. Baker, D. Blankenberg, R. Chakrabarty, N. Coraor, J. Goecks, G. Von Kuster, R. Lazarus, K. Li, J. Taylor, and K. Vincent. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. Genome Biology 11.

van der Goes van Naters, W., and J. R. R. Carlson. 2007. Receptors and Neurons for Fly Odors in Drosophila. Current Biology 17:606–612.

Gonzalez, F., P. Witzgall, and W. B. Walker. 2016. Protocol for Heterologous Expression of Insect Odourant Receptors in Drosophila. Frontiers in Ecology and Evolution 4:1–15.

Gottwald, T. 2010. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. Annual Review of Phytopathology 48:119–139.

Gouin, A., A. Bretaudeau, K. Nam, S. Gimenez, J. M. Aury, B. Duvic, F. Hilliou, N. Durand, N. Montagné, I. Darboux, S. Kuwar, T. Chertemps, D. Siaussat, A. Bretschneider, Y. Moné, S. J. Ahn, S. Hänniger, A. S. G. Grenet, D. Neunemann, F. Maumus, I. Luyten, K. Labadie, W. Xu, F. Koutroumpa, J. M. Escoubas, A. Llopis, M. Maïbèche-Coisne, F. Salasc, A. Tomar, A. R. Anderson, S. A. Khan, P. Dumas, M. Orsucci, J. Guy, C. Belser, A. Alberti, B. Noel, A. Couloux, J. Mercier, S. Nidelet, E. Dubois, N. Y. Liu, I. Boulogne, O. Mirabeau, G. Le Goff, K. Gordon, J. Oakeshott, F. L. Consoli, A. N. Volkoff, H. W. Fescemyer, J. H. Marden, D. S. Luthe, S. Herrero, D. G. Heckel, P. Wincker, G. J. Kergoat, J. Amselem, H. Quesneville, A. T. Groot, E. Jacquin-Joly, N. Nègre, C. Lemaitre, F. Legeai, E. D'Alençon, and P. Fournier. 2017. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (Spodoptera

frugiperda, Noctuidae) with different host-plant ranges. Scientific Reports 7:1–12.
Grabe, V., A. Baschwitz, H. K. M. Dweck, S. Lavista-Llanos, B. S. Hansson, and S. Sachse. 2016. Elucidating the Neuronal Architecture of Olfactory Glomeruli in the Drosophila Antennal Lobe. Cell Reports 16:3401–3413.
Grabe, V., and S. Sachse. 2018. Fundamental principles of the olfactory code. BioSystems 164:94–101.
Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B. W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, and A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature biotechnology 29:644–52.
Graziadei, P. P. C., and H. T. Gagne. 1976. Sensory innervation in the rim of the octopus sucker. Journal of Morphology 150:639–679.
Grimes, L. R., and H. H. Neunzig. 1986. Morphological Survey of the Maxillae in Last Stage Larvae of the Suborder Ditrysia (Lepidoptera): Palpi. Annals of the Entomological Society of America 79:491–509.
Große-Wilde, E., A. Svatoš, and J. Krieger. 2006. A Pheromone-binding protein mediates the bombykol-induced activation of a pheromone receptor in vitro. Chemical Senses 31:547–555.
Gu, S. H., R. N. Yang, M. B. Guo, G. R. Wang, K. M. Wu, Y. Y. Guo, J. J. Zhou, and Y. J. Zhang. 2013. Molecular identification and differential expression of sensory neuron membrane proteins in the antennae of the black cutworm moth Agrotis ipsilon. Journal of Insect Physiology 59:430–443.
Gullan, P. J., and P. S. Cranston. 1994. Insects: An Outline of Entomology. First. Chapman & Hall.
Gupta, N., and M. Stopfer. 2012. Functional analysis of a higher olfactory center, the lateral horn. Journal of Neuroscience 32:8138–8148.
Ha, T. S., and D. P. Smith. 2006. A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate-induced responses in Drosophila. Journal of Neuroscience 26:8727–8733.
Haas, B. J., A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. Macmanes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C. N. Dewey, R. Henschel, R. D. Leduc, N. Friedman, and A. Regev. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols 8:1494–1512.
Hagstrum, D. W., and T. W. Phillips. 2017. Evolution of Stored-Product Entomology: Protecting the World Food Supply. Annual Review of Entomology 62:379–397.
Hallberg, E., B. S. Hansson, and C. Löfstedt. 1999. Sensilla and Proprioceptors. Page Band 4: Arthropoda, 2 Hälfte: Insecta, Lepidoptera, Moths and Butterflies, Teilband/Part 36, Vol 2: Morphology, Physiology, and Development. DE GRUYTER, Berlin, Boston.
Hallem, E. A., and J. R. Carlson. 2006. Coding of Odors by a Receptor Repertoire. Cell 125:143–160.
Hallem, E. A., M. G. Ho, and J. R. Carlson. 2004. The Molecular Basis of Odor Coding in the Drosophila Antenna. Cell 117:965–979.

Hansson. 2002. A bug's smell – research into insect olfaction. Trens in Neurosciences 25:270–274.

Hansson, B. S., and S. Anton. 2000. ANTENNAL LOBE: New Developments. Annu. Rev. Entomol 45:203–231.

Harborne, J. B. 1993. Animal Pheromones and Defence Substances. Pages 211–242 Introduction to Ecological Biochemistry.

Hare, D., and R. Weseloh. 2009. Host seeking by parasitoids. Pages 463–466 Encyclopedia of insects. Second edi.

Harrison, R. M. 1986. Nitrogen and sulphur compounds. Handbook of Air Pollution Analysis:279–341.

Hatanaka, A. 1993. The biogeneration of green odour by green leaves. Phytochemistry 34:1201–1218.

Heisenberg, M. 2003. Mushroom body memoir: From maps to models. Nature Reviews Neuroscience 4:266–275.

Hou, X., D.-D. Zhang, J. K. Yuvaraj, J. A. Corcoran, M. N. Andersson, and C. Löfstedt. 2020. Functional characterization of odorant receptors from the moth Eriocrania semipurpurella: A comparison of results in the Xenopus oocyte and HEK cell systems. Insect Biochemistry and Molecular Biology 117:103289.

Howard, R. W., and G. J. Blomquist. 2005. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. Annual Review of Entomology 50:371–393.

Hussain, A., M. Zhang, H. K. Üçpunar, T. Svensson, E. Quillery, N. Gompel, R. Ignell, and I. C. Grunwald Kadow. 2016. Ionotropic Chemosensory Receptors Mediate the Taste and Smell of Polyamines. PLoS Biology 14:1–30.

Ito, K., K. Suzuki, P. Estes, M. Ramaswami, D. Yamamoto, and N. J. Strausfeld. 1998. The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in Drosophila melanogaster meigen. Learning and Memory 5:52–77.

Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, and P. S. Linsley. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nature Biotechnology 21:635–637.

Jackson, A. L., and P. S. Linsley. 2004. Noise amidst the silence: Off-target effects of siRNAs? Trends in Genetics 20:521–524.

Jacquin-Joly, E., F. Legeai, N. Montagné, C. Monsempes, M.-C. François, J. Poulain, F. Gavory, W. B. Walker III, B. S. Hansson, and M. C. Larsson. 2012. Candidate chemosensory Genes in Female Antennae of the Noctuid Moth Spodoptera littoralis. International Journal of Biological Sciences 8:1036–1050.

Jaeger, A. H., M. Stanley, Z. F. Weiss, P. Y. Musso, R. C. W. Chan, H. Zhang, D. Feldman-Kiss, and M. D. Gordon. 2018. A complex peripheral code for salt taste in drosophila. eLife 7:1–30.

Jallon, J. M. 1984. A few chemical words exchanged by Drosophila during courtship and mating. Behavior Genetics 14:441–478.

Jefferis, G. S. X. E., C. J. Potter, A. M. Chan, E. C. Marin, T. Rohlfing, C. R. Maurer, and L. Luo. 2007. Comprehensive Maps of Drosophila Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. Cell 128:1187–1203.

Jiang, X. J., H. Guo, C. Di, S. Yu, L. Zhu, L. Q. Huang, and C. Z. Wang. 2014. Sequence similarity and functional comparisons of pheromone receptor orthologs in two closely related Helicoverpa species. Insect Biochemistry and Molecular Biology 48:63–74.

Jin, R., N. Y. Liu, Y. Liu, and S. L. Dong. 2015. A larval specific OBP able to bind the major female sex pheromone component in Spodoptera exigua (Hübner). Journal of Integrative Agriculture 14:1356–1366.

Johnson, C. B., A. Kazantzis, M. Skoula, U. Mitteregger, and J. Novak. 2004. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of Origanum vulgare subsp. Hirtum, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. Phytochemical Analysis 15:286–292.

Jones, W. D., P. Cayirlioglu, I. Grunwald Kadow, and L. B. Vosshall. 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in Drosophila. Nature 445:86–90.

Jönsson, M., and P. Anderson. 1999. Electrophysiological response to herbivore-induced host plant volatiles in the moth Spodoptera littoralis. Physiological Entomology 24:377–385.

Jordan, M. D., A. Anderson, D. Begum, C. Carraher, A. Authier, S. D. G. Marshall, A. Kiely, L. N. Gatehouse, D. R. Greenwood, D. L. Christie, A. V. Kralicek, S. C. Trowell, and R. D. Newcomb. 2009. Odorant receptors from the light brown apple moth (Epiphyas postvittana) recognize important volatile compounds produced by plants. Chemical Senses 34:383–394.

Jørgensen, K., T. J. Almaas, F. Marion-poll, and H. Mustaparta. 2007. Electrophysiological characterization of responses from gustatory receptor neurons of sensilla chaetica in the moth heliothis virescens. Chemical Senses 32:863–879.

Joseph, R. M., and J. R. Carlson. 2015. Drosophila Chemoreceptors: A Molecular Interface Between the Chemical World and the Brain. Trends in Genetics 31:683–695.

Kaib, M., R. Brandl, and R. K. N. Bagine. 1991. Cuticular hydrocarbon profiles: A valuable tool in termite taxonomy. Naturwissenschaften 78:176–179.

Karlson, P., and M. Lüscher. 1959. "Pheromones": a New Term for a Class of Biologically Active Substances. Nature 183:55–56.

Karner, T., I. Kellner, A. Schultze, H. Breer, and J. Krieger. 2015. Co-expression of six tightly clustered odorant receptor genes in the antenna of the malaria mosquito Anopheles gambiae. Frontiers in Ecology and Evolution 3:1–8.

Katritzky, A. R., Z. Wang, S. Slavov, M. Tsikolia, D. Dobchev, N. G. Akhmedov, C. D. Hall, U. R. Bernier, G. G. Clark, and K. J. Linthicum. 2008. Synthesis and bioassay of improved mosquito repellents predicted from chemical structure. Proceedings of the National Academy of Sciences 105:7359–7364.

Kaupp, U. B. 2010. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. Nature Reviews Neuroscience 11:188–200.

Kehat, M., S. Greenberg, and Y. Tamaki. 1976. Field Evaluation of the Synthetic Sex Pheromone, as an Attractant for Males of the Cotton Leafworm, Spodoptera littoralis (Boisd.), in Israel. Applied Entomology and Zoology 11:45–52.

Keil, T. A. 1996. Sensilla on the maxillary palps of Helicoverpa armigera caterpillars: In search of the CO2-receptor. Tissue and Cell 28:703–717.

Keller, A., and L. B. Vosshall. 2007. Influence of odorant receptor repertoire on odor perception in humans and fruit flies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America 104:5614–5619.
Kent, K. S., and J. G. Hildebrand. 1987. Cephalic sensory pathways in the central nervous system of larval Manduca sexta (Lepidoptera: Sphingidae). Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 315:1–36.
Kepchia, D., P. Xu, R. Terryn, A. Castro, S. C. Schürer, W. S. Leal, and C. W. Luetje. 2019. Use of machine learning to identify novel, behaviorally active antagonists of the insect odorant receptor co-receptor (Orco) subunit. Scientific Reports 9:4055.
Kessler, A., and I. T. Baldwin. 2001. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. Science 291:2141–2144.
Kessler, A., and K. Morrel. 2010. Plant Volatile Signalling : Multitrophic Interactions in the Headspace. Pages 95–122 The Chemistry and Biology of Volatiles.
Kiely, A., A. Authier, A. V. Kralicek, C. G. Warr, and R. D. Newcomb. 2007. Functional analysis of a Drosophila melanogaster olfactory receptor expressed in Sf9 cells. Journal of Neuroscience Methods 159:189–194.
Kirkness, E. F., B. J. Haas, W. Sun, H. R. Braig, M. A. Perotti, J. M. Clark, S. H. Lee, H. M. Robertson, R. C. Kennedy, E. Elhaik, D. Gerlach, E. V. Kriventseva, C. G. Elsik, D. Graur, C. A. Hill, J. A. Veenstra, B. Walenz, J. M. C. Tubío, J. M. C. Ribeiro, J. Rozas, J. S. Johnston, J. T. Reese, A. Popadic, M. Tojo, D. Raoult, D. L. Reed, Y. Tomoyasu, E. Krause, O. Mittapalli, V. M. Margam, H. M. Li, J. M. Meyer, R. M. Johnson, J. Romero-Severson, J. P. VanZee, D. Alvarez-Ponce, F. G. Vieira, M. Aguadé, S. Guirao-Rico, J. M. Anzola, K. S. Yoon, J. P. Strycharz, M. F. Unger, S. Christley, N. F. Lobo, M. J. Seufferheld, N. K. Wang, G. A. Dasch, C. J. Struchiner, G. Madey, L. I. Hannick, S. Bidwell, V. Joardar, E. Caler, R. Shao, S. C. Barker, S. Cameron, R. V. Bruggner, A. Regier, J. Johnson, L. Viswanathan, T. R. Utterback, G. G. Sutton, D. Lawson, R. M. Waterhouse, J. C. Venter, R. L. Strausberg, M. R. Berenbaum, F. H. Collins, E. M. Zdobnov, and B. R. Pittendrigh. 2010. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:12168–12173.
Klocke, J. A., M. V. Darlington, and M. F. Balandrin. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of Hemizonia fitchii (Asteraceae). Journal of Chemical Ecology 13:2131–2141.
Knecht, Z. A., A. F. Silbering, J. Cruz, L. Yang, V. Croset, R. Benton, and P. A. Garrity. 2017. Ionotropic receptor-dependent moist and dry cells control hygrosensation in Drosophila. eLife 6:1–11.
Knudsen, J. T., R. Eriksson, J. Gershenzon, and B. Ståhl. 2006. Diversity and Distribution of Floral Scent. The Botanical Review 72:1–120.
Koerte, S., I. W. Keesey, M. A. Khallaf, L. Cortés Llorca, E. Grosse-Wilde, B. S. Hansson, and M. Knaden. 2018. Evaluation of the DREAM Technique for a High-Throughput Deorphanization of Chemosensory Receptors in Drosophila. Frontiers in Molecular Neuroscience 11:1–13.
Kogan, M., and R. Prokopy. 2009. Agricultural Entomology. Pages 4–8 Encyclopedia of insects. second edi.
Köhler, H.-R., and R. Triebskorn. 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides : Can We Track

Effects to the. Science 341:759–765.
Kondoh, Y., K. Y. Kaneshiro, K. I. Kimura, and D. Yamamoto. 2003. Evolution of sexual dimorphism in the olfactory brain of Hawaiian Drosophila. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270:1005–1013.
Koutroumpa, F. A., Z. Kárpáti, C. Monsempes, S. R. Hill, B. S. Hansson, E. Jacquin-Joly, J. Krieger, and T. Dekker. 2014. Shifts in sensory neuron identity parallel differences in pheromone preference in the European corn borer. Frontiers in Ecology and Evolution 2:1–12.
Koutroumpa, F. A., C. Monsempes, M.-C. François, A. de Cian, C. Royer, J.-P. Concordet, and E. Jacquin-Joly. 2016. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. Scientific Reports 6:29620.
Kramer, E. 1976. The orientation of walking honeybees in odour fields with small concentration gradients. Physiological Entomology 1:27–37.
Kreher, S. A., J. Y. Kwon, and J. R. Carlson. 2005. The molecular basis of odor coding in the Drosophila larva. Neuron 46:445–456.
Kreher, S. A., D. Mathew, J. Kim, and J. R. Carlson. 2008. Translation of Sensory Input into Behavioral Output via an Olfactory System. Neuron 59:110–124.
Krieger, J., O. Klink, C. Mohl, K. Raming, and H. Breer. 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 189:519–526.
Kuebler, L. S., C. Kelber, and C. J. Kleineidam. 2010. Distinct antennal lobe phenotypes in the leaf-cutting ant (Atta vollenweideri). Journal of Comparative Neurology 518:352–365.
Kurtovic, A., A. Widmer, and B. J. Dickson. 2007. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a Drosophila sex pheromone. Nature 446:542–546.
Kvist, T., K. B. Hansen, and H. Bräuner-Osborne. 2011. The use of Xenopus oocytes in drug screening. Expert Opinion on Drug Discovery 6:141–153.
Kwon, J. Y., A. Dahanukar, L. A. Weiss, and J. R. Carlson. 2007. The molecular basis of CO2 reception in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:3574–3578.
Kwon, J. Y., A. Dahanukar, L. A. Weiss, and J. R. Carlson. 2011. Molecular and cellular organization of the taste system in the Drosophila larva. Journal of Neuroscience 31:15300–15309.
Lander, E. S. . L., L. M. . Birren, B. Nusbaum, C. Zody, M. C. . Baldwin, J. Devon, K. Dewar, K. Doyle, M. FitzHugh, W. Funke, R. Gage, D. Harris, K. Heaford, A. Howland, J. Kann, L. Lehoczky, J. LeVine, R. McEwan, and P. McKernanKevin. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921.
Langmead, B. 2010. Aligning Short Sequencing Reads with Bowtie. Current Protocols in Bioinformatics.
Larsson, M. C., A. I. Domingos, W. D. Jones, M. E. Chiappe, H. Amrein, and L. B. Vosshall. 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. Neuron 43:703–714.
Laue, M. 2000. Immunolocalization of general odorant-binding protein in antennal sensilla of moth caterpillars. Arthropod Structure and Development 29:57–73.
Lavecchia, A. 2015. Machine-learning approaches in drug discovery: methods and applications.

Drug Discovery Today 20:318–331.
Lavecchia, A., and C. Di Giovanni. 2013. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. Current Medicinal Chemistry 20:2839–2860.
Leal, W. S. 2013. Odorant Reception in Insects : Roles of Receptors , Binding Proteins , and Degrading Enzymes. Annual Review of Entomology is 58:373–391.
Leal, W. S., L. Nikonova, and G. Peng. 1999. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, Bombyx mori. FEBS Letters 464:85–90.
Lee, H. B., Z. L. Sebo, Y. Peng, and Y. Guo. 2015. An optimized TALEN application for mutagenesis and screening in Drosophila melanogaster . Cellular Logistics 5:e1023423.
Lee, J. K., and N. J. Strausfeld. 1990. Structure, distribution and number of surface sensilla and their receptor cells on the olfactory appendage of the male moth Manduca sexta. Journal of neurocytology 19:519–38.
Legeai, F., S. Malpel, N. Montagné, C. Monsempes, F. Cousserans, C. Merlin, M. C. François, M. Maïbèche-Coisné, F. Gavory, J. Poulain, and E. Jacquin-Joly. 2011. An Expressed Sequence Tag collection from the male antennae of the Noctuid moth Spodoptera littoralis: A resource for olfactory and pheromone detection research. BMC Genomics 12:86.
Lei, H., T. A. Christensen, and J. G. Hildebrand. 2004. Spatial and temporal organization of ensemble representations for different odor classes in the moth antennal lobe. Journal of Neuroscience 24:11108–11119.
Leisgen, C., M. Kuester, and C. Methfessel. 2007. The Roboocyte. Pages 87–109 Patch-Clamp Methods and Protocols.
Leonhardt, S. D., F. Menzel, V. Nehring, and T. Schmitt. 2016. Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. Cell 164:1277–1287.
Li, B., and C. N. Dewey. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC bioinformatics 12:323.
Li, Y., J. Zhang, D. Chen, P. Yang, F. Jiang, X. Wang, and L. Kang. 2016. CRISPR/Cas9 in locusts: Successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor (Orco). Insect Biochemistry and Molecular Biology 79:27–35.
Lichtenthaler, H. K. 2010. Biosynthesis and Emission of Isoprene, Methylbutanol and Other Volatile Plant Isoprenoids. Page The Chemistry and Biology of Volatiles.
Lichtenthaler, H. K., and J. G. Zeidler. 2002. Isoprene and terpene biosynthesis. Pages 79–99 Trace Gas exchange in Forest Ecosystems.
Ling, F., A. Dahanukar, L. A. Weiss, J. Y. Kwon, and J. R. Carlson. 2014. The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of Drosophila. Journal of Neuroscience 34:7148–7164.
Liu, C., Y. Liu, M. Guo, D. Cao, S. Dong, and G. Wang. 2014a. Narrow tuning of an odorant receptor to plant volatiles in Spodoptera exigua (Hubner). Insect Molecular Biology 23:487–496.
Liu, C., Y. Liu, W. B. Walker, S. Dong, and G. Wang. 2013a. Identification and functional characterization of sex pheromone receptors in beet armyworm Spodoptera exigua (Hübner) 43:747–754.
Liu, C., J. Zhang, Y. Liu, G. Wang, and S. Dong. 2014b. Expression of SNMP1 and SNMP2

genes in antennal sensilla of Spodoptera exigua (Hübner). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 85:114–126.

Liu, J., C. Li, Z. Yu, P. Huang, H. Wu, C. Wei, N. Zhu, Y. Shen, Y. Chen, B. Zhang, W. M. Deng, and R. Jiao. 2012. Efficient and Specific Modifications of the Drosophila Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. Journal of Genetics and Genomics 39:209–215.

Liu, N. Y., W. Xu, S. L. Dong, J. Y. Zhu, Y. X. Xu, and A. Anderson. 2018. Genome-wide analysis of ionotropic receptor gene repertoire in Lepidoptera with an emphasis on its functions of Helicoverpa armigera. Insect Biochemistry and Molecular Biology 99:37–53.

Liu, R., A. Z. Holik, S. Su, N. Jansz, K. Chen, H. S. Leong, M. E. Blewitt, M.-L. L. Asselin-Labat, G. K. Smyth, and M. E. Ritchie. 2015. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. Nucleic Acids Research 43:e97–e97.

Liu, Y., C. Liu, K. Lin, and G. Wang. 2013b. Functional Specificity of Sex Pheromone Receptors in the Cotton Bollworm Helicoverpa armigera. PLoS ONE 8:e62094.

Ljungberg, H., P. Anderson, and B. S. Hansson. 1993. Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Insect Physiology 39:253–260.

Lockey, K. H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Comparative Biochemistry and Physiology 89B:595–645.

Lopez, L., V. Vouloutsi, A. Escuredo, E. Marcos, S. Bermudez i Badia, Z. Mathews, P. F. M. . Verschure, A. Ziyatdinov, and A. Perera i Llu. 2011. Moth-Like Chemo-Source Localization and Classification on an Indoor Autonomous Robot. Page On Biomimetics. InTech.

Loreto, F., J. Kesselmeier, and J.-P. Schnitzler. 2008. Volatile organic compounds in the biosphere-atmosphere system: a preface. Plant Biology 10:2–7.

Losey, J. E., and M. Vaughan. 2006. The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects. BioScience 56:311.

Loudon, C. 2009. Antennae. Pages 21–23 Encyclopedia of insects. Second edi.

Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15:550.

Lu, T., Y. T. Qiu, G. Wang, J. Y. Kwon, M. Rutzler, H. W. Kwon, R. J. Pitts, J. J. A. van Loon, W. Takken, J. R. Carlson, and L. J. Zwiebel. 2007. Odor Coding in the Maxillary Palp of the Malaria Vector Mosquito Anopheles gambiae. Current Biology 17:1533–1544.

Lundin, C., L. Käll, S. A. Kreher, K. Kapp, E. L. Sonnhammer, J. R. Carlson, G. von Heijne, and I. M. Nilsson. 2007. Membrane topology of the Drosophila OR83b odorant receptor. FEBS Letters 581:5601–5604.

Luo, Y., and J. R. Carlson. 2018. Sensory Biology: Structure of an Insect Chemoreceptor. Current Biology 28:R1202–R1205.

Ma, S., S. Zhang, F. Wang, Y. Liu, Y. Liu, H. Xu, C. Liu, Y. Lin, P. Zhao, and Q. Xia. 2012. Highly Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. PLoS ONE 7:e45035.

Maciel, M. V., S. M. Morais, C. M. L. Bevilaqua, R. A. Silva, R. S. Barros, R. N. Sousa, L. C. Sousa, E. S. Brito, and M. A. Souza-Neto. 2010. Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on Lutzomyia longipalpis. Veterinary Parasitology

167:1–7.
Mafra-neto, A., and R. T. Carde. 1994. Fine-scale structure of pheromone plumes modulates upwind orientation of flying moths Agenor 369:142–144.
Malnic, B., J. Hirono, T. Sato, and L. B. Buck. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. Cell 96:713–723.
Malpel, S., C. Merlin, M. C. François, and E. Jacquin-Joly. 2008. Molecular identification and characterization of two new Lepidoptera chemoreceptors belonging to the Drosophila melanogaster OR83b family. Insect Molecular Biology 17:587–596.
Mansouri, K., and R. S. Judson. 2016. In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity 1425.
Marin, E. C., G. S. X. E. Jefferis, T. Komiyama, H. Zhu, and L. Luo. 2002. Representation of the glomerular olfactory map in the Drosophila brain. Cell 109:243–255.
Martel, V., P. Anderson, B. S. Hansson, and F. Schlyter. 2009. Peripheral modulation of olfaction by physiological state in the Egyptian leaf worm Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Insect Physiology 55:793–797.
Martin, J. A., and Z. Wang. 2011. Next-generation transcriptome assembly. Nature Reviews Genetics 12:671–682.
Martin, S., and F. Drijfhout. 2009. A review of ant cuticular hydrocarbons. Journal of Chemical Ecology 35:1151–1161.
Martinez, T., G. Fabrias, and F. Camps. 1990. Sex pheromone biosynthetic pathway in Spodoptera littoralis and its activation by a neurohormone. Journal of Biological Chemistry 265:1381–1387.
Masse, N. Y., G. C. Turner, and G. S. X. E. Jefferis. 2009. Olfactory Information Processing in Drosophila. Current Biology 19:R700–R713.
Mathew, D., C. Martelli, E. Kelley-Swift, C. Brusalis, M. Gershow, A. D. T. Samuel, T. Emonet, and J. R. Carlsson. 2013. Functional diversity among sensory receptors in a Drosophila olfactory circuit. Proceedings of the National Academy of Sciences 110:E2134–E2143.
Matsui, K. 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Current Opinion in Plant Biology 9:274–280.
Matsui, K., and T. Koeduka. 2016. Green Leaf Volatiles in Plant Signaling and Response. Pages 427–443 *in* Y. Nakamura and Y. Li-Beisson, editors. Springer International Publishing, Cham.
Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 74:560–564.
Mayhew, P. J. 1997. Adaptive Patterns of Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. Oikos 79:417.
McCormick, A. C., G. A. Boeckler, T. G. Köllner, J. Gershenzon, and S. B. Unsicker. 2014. The timing of herbivore-induced volatile emission in black poplar (Populus nigra) and the influence of herbivore age and identity affect the value of individual volatiles as cues for herbivore enemies. BMC Plant Biology 14.
McGettigan, P. A. 2013. Transcriptomics in the RNA-seq era. Current Opinion in Chemical Biology 17:4–11.
McVeigh, L. J., and B. . Bettany. 1987. The development of lure and kill technique for control of the Egyptian cotton leafworm, Spodoptera littoralis. Bulletin SROP 10:59–60.

Meijerink, J., M. A. H. Braks, A. A. Brack, W. Adam, T. Dekker, M. a Posthumus, T. a V. a N. Beek, and J. J. A. Van Loon. 2000. Anopheles gambiae FROM HUMAN SWEAT SAMPLES. Journal of Chemical Ecology 26:1367–1382.

Melo, A. C. A., M. Rützler, R. J. Pitts, and L. J. Zwiebel. 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. Chemical Senses 29:403–410.

Melville, J., E. Burke, and J. Hirst. 2009. Machine Learning in Virtual Screening. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 12:332–343.

Mérey, G. E. Von, N. Veyrat, M. D. Alessandro, and T. C. J. Turlings. 2013. Herbivore-induced maize leaf volatiles affect attraction and feeding behavior of Spodoptera littoralis caterpillars 4:1–9.

Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies the next generation. Nature Reviews Genetics 11:31–46.

Mikheyev, A. S., and M. M. Y. Tin. 2014. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. Molecular Ecology Resources 14:1097–1102.

Millar, J. G. 2000. Polyene hydrocarbons and epoxides: A Second Major Class of Lepidopteran Sex Attractant Pheromones. Annual Review of Entomology 45:575–604.

Miller, J. R., & Cowles, R. S. (1990). Stimulo-deterrent diversion: A concept and its possible application to onion maggot control. *Journal of Chemical Ecology*, *16*(11), 3197–3212.

Missbach, C., H. K. M. Dweck, H. Vogel, A. Vilcinskas, M. C. Stensmyr, B. S. Hansson, and E. Grosse-Wilde. 2014. Evolution of insect olfactory receptors. eLife 2014:1–22.

Mitsuno, H., T. Sakurai, M. Murai, T. Yasuda, S. Kugimiya, R. Ozawa, H. Toyohara, J. Takabayashi, H. Miyoshi, and T. Nishioka. 2008. Identification of receptors of main sex-pheromone components of three Lepidopteran species. European Journal of Neuroscience 28:893–902.

Miura, N., T. Nakagawa, S. Tatsuki, K. Touhara, and Y. Ishikawa. 2009. A male-specific odorant receptor conserved through the evolution of sex pheromones in Ostrinia moth species. International Journal of Biological Sciences 5:319–330.

Miura, N., T. Nakagawa, K. Touhara, and Y. Ishikawa. 2010. Broadly and narrowly tuned odorant receptors are involved in female sex pheromone reception in Ostrinia moths. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40:64–73.

Miyamichi, K., F. Amat, F. Moussavi, C. Wang, I. Wickersham, N. R. Wall, H. Taniguchi, B. Tasic, Z. J. Huang, Z. He, E. M. Callaway, M. A. Horowitz, and L. Luo. 2011. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. Nature 472:191–199.

Mochizuki, F., N. Sugi, and T. Shibuya. 1992. Pheromone Sensilla of the Beet Armyworm, Spodoptera exigua(HUBNER)(Lepidoptera:Noctuidae). Applied Entomology and Zoology 27:547–556.

Mombearts, P. 1999. Seven-Transmembrane Proteins as Odorants and Chemosensory Receptors. Science 286:707–711.

Montagné, N., T. Chertemps, I. Brigaud, A. François, M. C. François, A. de Fouchier, P. Lucas, M. C. Larsson, and E. Jacquin-Joly. 2012. Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth Spodoptera littoralis by heterologous expression in Drosophila. European Journal of Neuroscience 36:2588–2596.

Montagné, N., A. de Fouchier, R. D. Newcomb, and E. Jacquin-Joly. 2015. Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. Progress in Molecular Biology and Translational Science 130:55–80.

Muñoz, L., G. Rosell, C. Quero, and A. Guerrero. 2008. Biosynthetic pathways of the pheromone of the Egyptian armyworm Spodoptera littoralis. Physiological Entomology 33:275–290.

Murlis, J., J. Elkinton, and R. Cardé. 1992. Odor Plumes And How Insects Use Them. Annual Review of Entomology 37:505–532.

Nakagawa, T., T. Sakurai, T. Nishioka, and K. Touhara. 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. Science 307:1638–1642.

Navarro, I., E. Mas, G. Fabriàs, and F. Camps. 1997. Identification and biosynthesis of (E,E) -10,12-Tetradecadienyl acetate in spodoptera littoralis female sex pheromone gland. Bioorganic and Medicinal Chemistry 5:1267–1274.

Navon, A., M. Wysoki, and S. Keren. 1983. Potency and effect ofBacillus thuringiensis preparations against larvae ofSpodoptera littoralis andBoarmia (Ascotis) selenaria. Phytoparasitica 11:3–11.

Nei, M., Y. Niimura, and M. Nozawa. 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: Roles of chance and necessity. Nature Reviews Genetics 9:951–963.

Nei, M., and A. P. Rooney. 2005. Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. Annual Review of Genetics 39:121–152.

Neish, A. C. 1960. Biosynthetic Pathways of Aromatic Compounds. Annual Review of Plant Physiology 11:55–80.

Nesbitt, B., P. Beevor, R. Cole, R. Lester, and R. Poppi. 1973. Sex pheromones of two noctuid moths. Nature New Biology 244:208–209.

Neuhaus, E. M., G. Gisselmann, W. Zhang, R. Dooley, K. Störtkuhl, and H. Hatt. 2005. Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of Drosophila melanogaster. Nature Neuroscience 8:15–17.

Ni, L., M. Klein, K. V. Svec, G. Budelli, E. C. Chang, A. J. Ferrer, R. Benton, A. D. T. Samuel, and P. A. Garrity. 2016. The ionotropic receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in Drosophila. eLife 5:1–12.

Ning, C., K. Yang, M. Xu, L. Q. Huang, and C. Z. Wang. 2016. Functional validation of the carbon dioxide receptor in labial palps of Helicoverpa armigera moths. Insect Biochemistry and Molecular Biology 73:12–19.

Nolte, A., N. W. Funk, L. Mukunda, P. Gawalek, A. Werckenthin, B. S. Hansson, D. Wicher, and M. Stengl. 2013. In situ Tip-Recordings Found No Evidence for an Orco-Based Ionotropic Mechanism of Pheromone-Transduction in Manduca sexta. PLoS ONE 8.

Nowotny, T., M. De Bruyne, A. Z. Berna, C. G. Warr, and S. C. Trowell. 2014. Drosophila olfactory receptors as classifiers for volatiles from disparate real world applications. Bioinspiration and Biomimetics 9.

Nyasembe, V. O., and B. Torto. 2014. Volatile phytochemicals as mosquito semiochemicals. Phytochemistry Letters 8:196–201.

Ochieng, S. A., P. Anderson, and B. S. Hansson. 1995. Antennal lobe projection patterns of olfactory receptor neurons involved in sex pheromone detection in Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). Tissue and Cell 27:221–232.

Oliferenko, P. V., A. A. Oliferenko, G. I. Poda, D. I. Osolodkin, G. G. Pillai, U. R. Bernier, M. Tsikolia, N. M. Agramonte, G. G. Clark, K. J. Linthicum, and A. R. Katritzky. 2013. Promising Aedes aegypti Repellent Chemotypes Identified through Integrated QSAR, Virtual Screening, Synthesis, and Bioassay. PLoS ONE 8:1–13.

Olivier, V., C. Monsempes, M. C. François, E. Poivet, and E. Jacquin-Joly. 2011. Candidate chemosensory ionotropic receptors in a Lepidoptera. Insect Molecular Biology 20:189–199.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289:739–745.

Papke, R. L., and C. Smith-Maxwell. 2009. High Throughput Electrophysiology with Xenopus Oocytes. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 12:38–50.

Papke, R. L., and C. Stokes. 2010. Working with OpusXpress: Methods for high volume oocyte experiments. Methods 51:121–133.

Patch, H. M., R. A. Velarde, K. K. O. Walden, and H. M. Robertson. 2009. A candidate pheromone receptor and two odorant receptors of the hawkmoth Manduca sexta. Chemical Senses 34:305–316.

Pelletier, J., A. Guidolin, Z. Syed, A. J. Cornel, and W. S. Leal. 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. Journal of Chemical Ecology 36:245–248.

Pelosi, P., I. Iovinella, J. Zhu, G. Wang, and F. R. Dani. 2018. Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. Biological Reviews 93:184–200.

Pelosi, P., J. J. Zhou, L. P. Ban, and M. Calvello. 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. Cellular and Molecular Life Sciences 63:1658–1676.

Persuy, M.-A., G. Sanz, A. Tromelin, T. Thomas-Danguin, J.-F. Gibrat, and E. Pajot-Augy. 2015. Mammalian Olfactory Receptors. Pages 1–36 Progress in Molecular Biology and Translational Science.

Pevsner, J. 2015. Bioinformatics and Functional Genomics. Third edit. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Pickett, J. A., C. M. Woodcock, C. A. O. Midega, and Z. R. Khan. 2014. Push-pull farming systems. Current Opinion in Biotechnology 26:125–132.

Piesik, D., D. Rochat, K. J. Delaney, and F. Marion-Poll. 2013. Orientation of European corn borer first instar larvae to synthetic green leaf volatiles. Journal of Applied Entomology 137:234–240.

Piesik, D., D. Rochat, J. van der Pers, and F. Marion-Poll. 2009. Pulsed odors from maize or spinach elicit orientation in European corn borer neonate larvae. Journal of Chemical Ecology 35:1032–1042.

Poivet, E. 2012. Capacités olfactives des chenilles de la noctuelle Spodoptera littoralis et modulation par la prise alimentaire.

Poivet, E., A. Gallot, N. Montagné, N. Glaser, F. Legeai, and E. Jacquin-Joly. 2013. A Comparison of the Olfactory Gene Repertoires of Adults and Larvae in the Noctuid Moth Spodoptera littoralis. PLoS ONE 8:e60263.

Poivet, E., K. Rharrabe, C. Monsempes, N. Glaser, D. Rochat, M. Renou, F. Marion-Poll, and E. Jacquin-Joly. 2012. The use of the sex pheromone as an evolutionary solution to food source

selection in caterpillars. Nature Communications 3:1047.
Popescu, A., L. Couton, T. J. Almaas, J. P. Rospars, G. A. Wright, F. Marion-Poll, and S. Anton. 2013. Function and central projections of gustatory receptor neurons on the antenna of the noctuid moth Spodoptera littoralis. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 199:403–416.
Powell, J. 2009. Encyclopedia of Insects. Pages 559–587 Encyclopedia of insects. Second edi. Elsevier.
Proffit, M., M. A. Khallaf, D. Carrasco, M. C. Larsson, and P. Anderson. 2015. "Do you remember the first time?" Host plant preference in a moth is modulated by experiences during larval feeding and adult mating. Ecology Letters 18:365–374.
Quero, C., P. Lucas, M. Renou, and A. Guerrero. 1996. Behavioral responses of Spodoptera littoralis males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. Journal of Chemical Ecology 22:1087–1102.
Raji, J. I., N. Melo, J. S. Castillo, S. Gonzalez, V. Saldana, M. C. Stensmyr, and M. DeGennaro. 2019. Aedes aegypti Mosquitoes Detect Acidic Volatiles Found in Human Odor Using the IR8a Pathway. Current Biology 29:1253-1262.e7.
Ramdya, P., and R. Benton. 2010. Evolving olfactory systems on the fly. Trends in Genetics 26:307–316.
Ray, A., W. van der Goes van Naters, T. Shiraiwa, and J. R. Carlson. 2007. Mechanisms of Odor Receptor Gene Choice in Drosophila. Neuron 53:353–369.
Reid, W., and D. A. O'Brochta. 2016. Applications of genome editing in insects. Current Opinion in Insect Science 13:43–54.
Rharrabe, K., E. Jacquin-Joly, and F. Marion-Poll. 2014. Electrophysiological and behavioral responses of Spodoptera littoralis caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. Frontiers in Ecology and Evolution 2:5.
Rhoads, A., and K. F. Au. 2015. PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics, Proteomics and Bioinformatics 13:278–289.
Riddiford, L. M. 1967. Trans-2-Hexenal: Mating Stimulant for Polyphemus Moths. Science 158:139–141.
Riffell, J. A., H. Lei, T. A. Christensen, and J. G. Hildebrand. 2009. Characterization and Coding of Behaviorally Significant Odor Mixtures. Current Biology 19:335–340.
Robertson, H. M. 2015. The insect chemoreceptor superfamily is ancient in animals. Chemical Senses 40:609–614.
Robertson, H. M., R. L. Baits, K. K. O. Walden, A. Wada-Katsumata, and C. Schal. 2018. Enormous expansion of the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach Blattella germanica. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 330:265–278.
Robertson, H. M., and K. W. Wanner. 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, Apis mellifera: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. Genome Research 16:1395–1403.
Robertson, H. M., C. G. Warr, and J. R. Carlson. 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in Drosophila melanogaster. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:14537–14542.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140.
Roessingh, P., S. Xu, and S. B. J. Menken. 2007. Olfactory receptors on the maxillary palps of small ermine moth larvae: Evolutionary history of benzaldehyde sensitivity. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 193:635–647.
Rogers, M. E., M. Sun, M. R. Lerner, and R. G. Vogt. 1997. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth Antheraea polyphemus with homology to the CD36 family of membrane proteins. Journal of Biological Chemistry 272:14792–14799.
Rytz, R., V. Croset, and R. Benton. 2013. Ionotropic Receptors (IRs): Chemosensory ionotropic glutamate receptors in Drosophila and beyond. Insect Biochemistry and Molecular Biology 43:888–897.
Saina, M., H. Busengdal, C. Sinigaglia, L. Petrone, P. Oliveri, F. Rentzsch, and R. Benton. 2015. A cnidarian homologue of an insect gustatory receptor functions in developmental body patterning. Nature Communications 6.
Sakurai, T., H. Mitsuno, A. Mikami, K. Uchino, M. Tabuchi, F. Zhang, H. Sezutsu, and R. Kanzaki. 2015. Targeted disruption of a single sex pheromone receptor gene completely abolishes in vivo pheromone response in the silkmoth. Scientific Reports 5:1–2.
Sakurai, T., T. Nakagawa, H. Mitsuno, H. Mori, Y. Endo, S. Tanoue, Y. Yasukochi, K. Touhara, and T. Nishioka. 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkmoth Bombyx mori. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101:16653–8.
Salama, H. ., and A. Shoukry. 1972. Flight Range of the Moth of the Cotton Leaf Worm Spodoptera littoralis (Bois.). Journal of Applied Entomology 71:181–184.
Salama, H. S., N. Z. Dimetry, and S. A. Salem. 1971. On the Host Preference and Biology of the Cotton Leaf Worm Spodoptera littoralis Bois. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 67:261–266.
Salama, H. S., M. S. Foda, and A. Sharaby. 1989. A proposed new biological standard for bioassay of bacterial insecticides vs. Spodoptera spp. Tropical Pest Management 35:326–330.
Salecker, I., and D. Malun. 1999. Development of Olfactory Glomeruli. Insect Olfaction:207–242.
Salloum, A., V. Colson, and F. Marion-Poll. 2011. Appetitive and aversive learning in Spodoptera littoralis larvae. Chemical Senses 36:725–731.
Sánchez-Gracia, A., F. G. Vieira, and J. Rozas. 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. Heredity 103:208–216.
Sandler, B. H., L. Nikonova, W. S. Leal, and J. Clardy. 2000. Sexual attraction in the silkworm moth structure of the.pdf. Chemistry & Biology:143–151.
Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 74:5463–5467.
Sato, K., M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L. B. Vosshall, and K. Touhara. 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. Nature 452:1002–6.
Saveer, A. M., S. H. Kromann, G. Birgersson, M. Bengtsson, T. Lindblom, A. Balkenius, B. S.

Hansson, P. Witzgall, P. G. Becher, and R. Ignell. 2012. Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 279:2314–2322.

Scala, A., S. Allmann, R. Mirabella, M. A. Haring, and R. C. Schuurink. 2013. Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. International Journal of Molecular Sciences 14:17781–17811.

Scaloni, A., M. Monti, S. Angeli, and P. Pelosi. 1999. Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from Bombyx mori. Biochemical and Biophysical Research Communications 266:386–391.

Schadt, E. E., S. Turner, and A. Kasarskis. 2010. A window into third-generation sequencing. Human Molecular Genetics 19:227–240.

Schal, C., V. L. Sevala, H. P. Young, and J. A. S. Bachmann. 1998. Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues. American Zoologist 38:382–393.

Schmieder, R., Y. W. Lim, and R. Edwards. 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. Bioinformatics 28:433–435.

Schneider, D. 1969. Insect Olfaction: Deciphering System for Chemical Messages. Science 163:1031–1037.

Schoonhoven, L., and J. J. . Van Loon. 2002. An inventory of taste in caterpillars: Each species its own key. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 48:215–263.

Schoonhoven, L. M. 1987. What Makes a Caterpillar Eat? The Sensory Code Underlying Feeding Behavior. Pages 69–97 *in* R. . Chapman, editor. Perspectives in Chemoreception and Behavior. Springer US.

Schoonhoven, L. M., and F. Blom. 1988. Chemoreception and feeding behaviour in a caterpillar: towards a model of brain functioning in insects. Entomologia Experimentalis et Applicata 49:123–129.

Schuckel, J., K. K. Siwicki, and M. Stengl. 2007. Putative circadian pacemaker cells in the antenna of the hawkmoth Manduca sexta. Cell and Tissue Research 330:271–278.

Schultzhaus, J. N., S. Saleem, H. Iftikhar, and G. E. Carney. 2017. The role of the Drosophila lateral horn in olfactory information processing and behavioral response. Journal of Insect Physiology 98:29–37.

Scott, K., R. Brady, A. Cravchik, P. Morozov, A. Rzhetsky, C. Zuker, and R. Axel. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in Drosophila. Cell 104:661–673.

Scriven, R., and C. E. Meloan. 1984. l , 3 , 3-TRIMETHYL-2-OXABICYCLO [2 , 2 , 2] OCTANE (CINEOLE) THAT REPELS THE AMERICAN COCKROACH , PERIPLANETA AMERICANA 1. The Ohio Journal of Science 1984:85–88.

Seada, M. A. 2015. Antennal morphology and sensillum distribution of female cotton leaf worm Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). The Journal of Basic & Applied Zoology 68:10–18.

Seada, M. A., R. Ignell, A. N. Al Assiuty, and P. Anderson. 2018. Functional Characterization of the Gustatory Sensilla of Tarsi of the Female Polyphagous Moth Spodoptera littoralis. Frontiers in Physiology 9:1–12.

Seki, Y., H. K. M. Dweck, J. Rybak, D. Wicher, S. Sachse, and B. S. Hansson. 2017. Olfactory coding from the periphery to higher brain centers in the Drosophila brain. BMC Biology 15:56.

Semmelhack, J. L., and J. W. Wang. 2009. Select Drosophila glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. Nature 459:218–223.

Sengupta, P., J. H. Chou, and C. I. Bargmann. 1996. odr-10 Encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. Cell 84:899–909.

Shanbhag, S., B. Müller, and R. Steinbrecht. 1999. Atlas of olfactory organs of Drosophila melanogaster 1. Types, external organization, innervation. Intl J Ins Morph Emb 28:377–397.

Shendure, J., S. Balasubramanian, G. M. Church, W. Gilbert, J. Rogers, J. A. Schloss, and R. H. Waterston. 2017. DNA sequencing at 40: Past, present and future. Nature 550:345–353.

Silbering, A. F., R. Rytz, Y. Grosjean, L. Abuin, P. Ramdya, G. S. X. E. Jefferis, and R. Benton. 2011. Complementary Function and Integrated Wiring of the Evolutionarily Distinct Drosophila Olfactory Subsystems. Journal of Neuroscience 31:13357–13375.

Simão, F. A., R. M. Waterhouse, P. Ioannidis, E. V. Kriventseva, and E. M. Zdobnov. 2015. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31:3210–3212.

Simpson, J. H., and L. L. Looger. 2018. Functional imaging and optogenetics in drosophila. Genetics 208:1291–1309.

Sisay, B., J. Simiyu, E. Mendesil, P. Likhayo, G. Ayalew, S. Mohamed, S. Subramanian, and T. Tefera. 2019. Fall Armyworm, Spodoptera frugiperda Infestations in East Africa: Assessment of Damage and Parasitism. Insects 10:195.

Slone, J., J. Daniels, and H. Amrein. 2007. Sugar Receptors in Drosophila. Current Biology 17:1809–1816.

Smart, R., A. Kiely, M. Beale, E. Vargas, C. Carraher, A. V. Kralicek, D. L. Christie, C. Chen, R. D. Newcomb, and C. G. Warr. 2008. Drosophila odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38:770–780.

Smidler, A. L., O. Terenzi, J. Soichot, E. A. Levashina, and E. Marois. 2013. Targeted Mutagenesis in the Malaria Mosquito Using TALE Nucleases. PLoS ONE 8:e74511.

Smith, C. D., A. Zimin, C. Holt, E. Abouheif, R. Benton, E. Cash, V. Croset, C. R. Currie, E. Elhaik, C. G. Elsik, M. J. Fave, V. Fernandes, J. Gadau, J. D. Gibson, D. Graur, K. J. Grubbs, D. E. Hagen, M. Helmkampf, J. A. Holley, H. Hu, A. S. I. Viniegra, B. R. Johnson, R. M. Johnson, A. Khila, J. W. Kim, J. Laird, K. A. Mathis, J. A. Moeller, M. C. Muñoz-Torres, M. C. Murphy, R. Nakamura, S. Nigam, R. P. Overson, J. E. Placek, R. Rajakumar, J. T. Reese, H. M. Robertson, C. R. Smith, A. V. Suarez, G. Suen, E. L. Suhr, S. Tao, C. W. Torres, E. Van Wilgenburg, L. Viljakainen, K. K. O. Walden, A. L. Wild, M. Yandell, J. A. Yorke, and N. D. Tsutsui. 2011. Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (Linepithema humile). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:5673–5678.

Sneh, B., and S. Schuster. 1983. Effect of exposure to sublethal concentration of Bacillus thuringiensis Berliner ssp. entomocidus on the susceptibility to the endotoxin of subsequent

generations of the Egyptian Cotton Leafworm Spodoptera littoralis Boisd. (Lep., Noctuidae). Journal of Applied Entomology 96:425–428.
Sorek, R., C. M. Lawrence, and B. Wiedenheft. 2013. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. Annual Review of Biochemistry 82:237–266.
Sosulski, D. L., M. Lissitsyna Bloom, T. Cutforth, R. Axel, and S. R. Datta. 2011. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. Nature 472:213–219.
Sparks, J. T., J. D. Bohbot, and J. C. Dickens. 2015. Olfactory disruption: Toward controlling important insect vectors of disease. Page Progress in Molecular Biology and Translational Science. First edition. Elsevier Inc.
Spreen, T. H., J.-P. Baldwin, and S. H. Futch. 2014. An Economic Assessment of the Impact of Huanglongbing on Citrus Tree Plantings in Florida. HortScience 49:1052–1055.
Steinbrecht, R. A. 1997. Pores structures in insect olfactory sensilla: A review of data and concepts. International Journal of Insect Morphology and Embryology 26:229–245.
Stengl, M., and N. W. Funk. 2013. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 199:897–909.
Stensmyr, M. C., H. K. M. Dweck, A. Farhan, I. Ibba, A. Strutz, L. Mukunda, J. Linz, V. Grabe, K. Steck, S. Lavista-Llanos, D. Wicher, S. Sachse, M. Knaden, P. G. Becher, Y. Seki, and B. S. Hansson. 2012. A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in drosophila. Cell 151:1345–1357.
Stocker, R. F. 1994. The organization of the chemosensory system in Drosophila melanogaster: a rewiew. Cell and Tissue Research 275:3–26.
Stockinger, P., D. Kvitsiani, S. Rotkopf, L. Tirián, and B. J. Dickson. 2005. Neural circuitry that governs Drosophila male courtship behavior. Cell 121:795–807.
Stopfer, M., S. Bhagavan, B. H. Smith, and G. Laurent. 1997. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. Nature 390:70–74.
Stork, N. E. 2017. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? Annual Review of Entomology 63:31–45.
Strausfeld, N. J., and J. G. Hildebrand. 1999. Olfactory systems: Common design, uncommon origins? Current Opinion in Neurobiology 9:634–639.
Styrsky, J. D., and M. D. Eubanks. 2007. Ecological consequences of interactions between ants and honeydew-producing insects. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 274:151–164.
Su, C.-Y., K. Menuz, and J. R. Carlson. 2009. Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. Cell 139:45–59.
Suh, E., J. D. Bohbot, and L. J. Zwiebel. 2014. Peripheral olfactory signaling in insects. Current Opinion in Insect Science 6:86–92.
Sun, M., Y. Liu, W. B. Walker, C. Liu, K. Lin, S. Gu, Y. Zhang, J. Zhou, and G. Wang. 2013. Identification and Characterization of Pheromone Receptors and Interplay between Receptors and Pheromone Binding Proteins in the Diamondback Moth, Plutella xyllostella. PLoS ONE 8.
Tamaki, Y., and T. Yushima. 1974. Sex pheromone of the cotton leafworm, Spodoptera littoralis. Journal of Insect Physiology 20:1005–1014.

Tanaka, K., Y. Uda, Y. Ono, T. Nakagawa, M. Suwa, R. Yamaoka, and K. Touhara. 2009. Highly Selective Tuning of a Silkworm Olfactory Receptor to a Key Mulberry Leaf Volatile. Current Biology 19:881–890.

Tanaka, N. K., T. Awasaki, T. Shimada, and K. Ito. 2004. Integration of Chemosensory Pathways in the Drosophila Second-Order Olfactory Centers. Current Biology 14:449–457.

Tauxe, G. M., D. Macwilliam, S. M. Boyle, T. Guda, and A. Ray. 2013. Targeting a Dual Detector of Skin and CO 2 to Modify Mosquito Host Seeking. CELL 155:1365–1379.

Terenius, O., A. Papanicolaou, J. S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J. L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F. Chevalier, D. P. Collinge, C. M. Crava, R. A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felföldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A. S. Gandhe, H. S. Gatehouse, L. N. Gatehouse, J. M. Giebultowicz, I. Gómez, C. J. P. Grimmelikhuijzen, A. T. Groot, F. Hauser, D. G. Heckel, D. D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J. J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M. R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P. J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki, M. Papakonstantinou, A. Popadic, M. V. Rajam, S. Saenko, R. M. Simpson, M. Soberón, M. R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C. W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J. Nagaraju, R. H. ffrench-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L. Swevers, and G. Smagghe. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. Journal of Insect Physiology 57:231–245.

Thiéry, D., S. Derridj, P.-A. Calatayud, N. Maher, and F. Marion-Poll. 2013. L'insecte au contact des plantes. Pages 347–368 Interactions insectes-plantes.

Thomas, M. L., and L. W. Simmons. 2009. Sexual selection on cuticular hydrocarbons in the Australian field cricket, Teleogryllus oceanicus. BMC Evolutionary Biology 9:1–12.

Thomas, P., and T. G. Smart. 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 51:187–200.

Thöming, G., M. C. Larsson, B. S. Hansson, and P. Anderson. 2013a. Comparison of plant preference hierarchies of male and female moths and the impact of larval rearing hosts. Ecology 94:1744–1752.

Thöming, G., M. C. Larsson, B. S. Hansson, and P. Anderson. 2013b. Comparison of plant preference hierarchies of male and female moths and the impact of larval rearing hosts. Ecology 94:1744–1752.

Thompson, S. N., and S. J. Simpson. 2009. Nutrition. Pages 715–721 Encyclopedia of insects. Second edi.

Touhara, K., S. Sengoku, K. Inaki, A. Tsuboi, J. Hirono, T. Sato, H. Sakano, and T. Haga. 1999. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:4040–4045.

Touhara, K., and L. B. Vosshall. 2009. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. Annual Review of Physiology 71:307–332.

Tsitoura, P., E. Andronopoulou, D. Tsikou, A. Agalou, M. P. Papakonstantinou, G. A. Kotzia, V. Labropoulou, L. Swevers, Z. Georgoussi, and K. Iatrou. 2010. Expression and membrane topology of Anopheles gambiae odorant receptors in lepidopteran insect cells. PLoS ONE 5.

Urnov, F. D., E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, and P. D. Gregory. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature Reviews Genetics 11:636–646.

Venkatesh, S., and R. N. Singh. 1984. Sensilla on the third antennal segment of Drosophila melanogaster meigen (Diptera : Drosophilidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology 13:51–63.

Verhulst, N. O., H. Beijleveld, B. G. Knols, W. Takken, G. Schraa, H. J. Bouwmeester, and R. C. Smallegange. 2009. Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. Malaria Journal 8:1–12.

Vickers, N. J. 2000. Mechanisms of Animal Navigation in Odor Plumes. Biological Bulletin 198:203–212.

Vosshall, L. B., H. Amrein, P. S. Morozov, A. Rzhetsky, and R. Axel. 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the Drosophila antenna. Cell 96:725–736.

Vosshall, L. B., and B. S. Hansson. 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. Chemical Senses 36:497–498.

Vosshall, L. B., and R. F. Stocker. 2007. Molecular Architecture of Smell and Taste in Drosophila . Annual Review of Neuroscience 30:505–533.

Waku, Y. 1991. Developmental changes of the antenna and its neurons in the silkworm, Bombyx mori, with special regard to larval-pupal transformation. Journal of Morphology 207:253–271.

Walker, W. B., F. Gonzalez, S. F. Garczynski, and P. Witzgall. 2016. The chemosensory receptors of codling moth Cydia pomonella-expression in larvae and adults. Scientific Reports 6:1–15.

Walker, W. B., A. Roy, P. Anderson, F. Schlyter, B. S. Hansson, and M. C. Larsson. 2019. Transcriptome Analysis of Gene Families Involved in Chemosensory Function in Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). BMC Genomics 20:428.

Wang, B., Y. Liu, K. He, and G. Wang. 2016a. Comparison of research methods for functional characterization of insect olfactory receptors. Scientific Reports 6:32806.

Wang, B., Y. Liu, K. He, and G. Wang. 2016b. Comparison of research methods for functional characterization of insect olfactory receptors. Scientific Reports 6:32806.

Wang, G. R., A. F. Carey, J. R. Carlson, and L. J. Zwiebel. 2010. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito Anopheles gambiae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:4418–4423.

Wang, G., G. M. Vásquez, C. Schal, L. J. Zwiebel, and F. Gould. 2011. Functional characterization of pheromone receptors in the tobacco budworm Heliothis virescens. Insect Molecular Biology 20:125–133.

Wanner, K. W., A. S. Nichols, K. K. O. Walden, A. Brockmann, C. W. Luetje, and H. M. Robertson. 2007. A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:14383–14388.

Von Der Weid, B., D. Rossier, M. Lindup, J. Tuberosa, A. Widmer, J. D. Col, C. Kan, A. Carleton, and I. Rodriguez. 2015. Large-scale transcriptional profiling of chemosensory neurons identifies receptor-ligand pairs in vivo. Nature Neuroscience 18:1455–1463.

Weiss, L. A., A. Dahanukar, J. Y. Kwon, D. Banerjee, and J. R. Carlson. 2011. The Molecular

and Cellular Basis of Bitter Taste in Drosophila. Neuron 69:258–272.
Wells, M. J. 1963. Taste By Touch: Some Experiments With Octopus. J. Exp. Biol 40:187–193.
Wetzel, C. H., H.-J. Behrendt, G. Gisselmann, K. F. Stortkuhl, B. Hovemann, and H. Hatt. 2001. Functional expression and characterization of a Drosophila odorant receptor in a heterologous cell system. Proceedings of the National Academy of Sciences 98:9377–9380.
WHO (World Health Organization). 2020. Vector control. https://www.who.int/vector-control/en/.
Wicher, D., R. Schäfer, R. Bauernfeind, M. C. Stensmyr, R. Heller, S. H. Heinemann, and B. S. Hansson. 2008. Drosophila odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. Nature 452:1007–1011.
Williams, L., P. E. Evans, and W. S. Bowers. 2001. Defensive chemistry of an aposematic bug, Pachycoris stallii uhler and volatile compounds of its host plant Croton californicus Muell.-Arg. Journal of Chemical Ecology 27:203–216.
Witzgall, P., P. Kirsch, and A. Cork. 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. Journal of Chemical Ecology 36:80–100.
Wong, A. M., J. W. Wang, and R. Axel. 2002. Spatial representation of the glomerular map in the Drosophila protocerebrum. Cell 109:229–241.
Xiao, S., J. S. Sun, and J. R. Carlson. 2019. Robust olfactory responses in the absence of odorant binding proteins. eLife 8:1–17.
Yang, B., T. Fujii, Y. Ishikawa, and T. Matsuo. 2016. Targeted mutagenesis of an odorant receptor co-receptor using TALEN in Ostrinia furnacalis. Insect Biochemistry and Molecular Biology 70:53–59.
Yao, C. A., R. Ignell, and J. . . Carlson. 2005. Chemosensory Coding by Neurons in the Coeloconic Sensilla of the Drosophila Antenna. Journal of Neuroscience 25:8359–8367.
Yi, Z., D. Liu, X. Cui, and Z. Shang. 2016. Morphology and Ultrastructure of Antennal Sensilla in Male and Female Agrilus mali (Coleoptera: Buprestidae). Journal of Insect Science 16:87.
Younus, F., T. Chertemps, S. L. Pearce, G. Pandey, F. Bozzolan, C. W. Coppin, R. J. Russell, M. Maïbèche-Coisne, and J. G. Oakeshott. 2014. Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems in the antennal transcriptome of Drosophila melanogaster. Insect Biochemistry and Molecular Biology 53:30–43.
Yuvaraj, J. K., M. N. Andersson, J. A. Corcoran, O. Anderbrant, and C. Löfstedt. 2018. Functional characterization of odorant receptors from Lampronia capitella suggests a non-ditrysian origin of the lepidopteran pheromone receptor clade. Insect Biochemistry and Molecular Biology 100:39–47.
Yuvaraj, J. K., J. A. Corcoran, M. N. Andersson, R. D. Newcomb, O. Anderbrant, and C. Löfstedt. 2017. Characterization of Odorant Receptors from a Non-ditrysian Moth, Eriocrania semipurpurella Sheds Light on the Origin of Sex Pheromone Receptors in Lepidoptera. Molecular Biology and Evolution:1–14.
Zakir, A., M. Bengtsson, M. M. Sadek, B. S. Hansson, P. Witzgall, and P. Anderson. 2013. Specific response to herbivore-induced de novo synthesized plant volatiles provides reliable information for host plant selection in a moth. Journal of Experimental Biology 216:3257–3263.
Zhan, S., C. Merlin, J. L. Boore, and S. M. Reppert. 2011. The monarch butterfly genome yields

insights into long-distance migration. Cell 147:1171–1185.
Zhang, H.-J., W. Xu, Q. Chen, L.-N. Sun, A. Anderson, Q.-Y. Xia, and A. Papanicolaou. 2020. A phylogenomics approach to characterizing sensory neuron membrane proteins (SNMPs) in Lepidoptera. Insect Biochemistry and Molecular Biology:103313.
Zhang, J., S. Bisch-Knaden, R. A. Fandino, S. Yan, G. F. Obiero, E. Grosse-Wilde, B. S. Hansson, and M. Knaden. 2019. The olfactory coreceptor IR8a governs larval feces-mediated competition avoidance in a hawkmoth. Proceedings of the National Academy of Sciences 116:201913485.
Zhang, J., C. C. Liu, S. W. Yan, Y. Liu, M. B. Guo, S. L. Dong, and G. R. Wang. 2013a. An odorant receptor from the common cutworm (Spodoptera litura) exclusively tuned to the important plant volatile cis-3-Hexenyl acetate. Insect Molecular Biology 22:424–432.
Zhang, J., S. Yan, Y. Liu, E. Jacquin-joly, S. Dong, and G. Wang. 2015. Identification and Functional Characterization of Sex Pheromone Receptors in the Common Cutworm (Spodoptera litura). Chemical Senses 40:7–16.
Zhang, L., D. Fourches, A. Sedykh, H. Zhu, A. Golbraikh, S. Ekins, J. Clark, M. C. Connelly, M. Sigal, D. Hodges, A. Guiguemde, R. K. Guy, and A. Tropsha. 2013b. Discovery of novel antimalarial compounds enabled by QSAR-based virtual screening. Journal of Chemical Information and Modeling 53:475–492.
Zhang, X., I. R. S. Ferreira, and F. Schnorrer. 2014a. A simple TALEN-based protocol for efficient genome-editing in Drosophila. Methods 69:32–37.
Zhang, Y. N., J. Zhang, S. W. Yan, H. T. Chang, Y. Liu, G. R. Wang, and S. L. Dong. 2014b. Functional characterization of sex pheromone receptors in the purple stem borer, Sesamia inferens (Walker). Insect Molecular Biology 23:611–620.
Zhang, Y. V., J. Ni, and C. Montell. 2013c. The molecular basis for attractive salt-taste coding in drosophila. Science 340:1334–1338.
Zheng, X. L., X. P. Cong, X. P. Wang, and C. L. Lei. 2011. A review of geographic distribution, overwintering and migration in spodoptera exigua Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of the Entomological Research Society 13:39–48.
Zhou, X., J. D. Slone, A. Rokas, S. L. Berger, J. Liebig, A. Ray, D. Reinberg, and L. J. Zwiebel. 2012. Phylogenetic and Transcriptomic Analysis of Chemosensory Receptors in a Pair of Divergent Ant Species Reveals Sex-Specific Signatures of Odor Coding. PLoS Genetics 8.
Zhou, Y. Le, X. Q. Zhu, S. H. Gu, H. huan Cui, Y. Y. Guo, J. J. Zhou, and Y. J. Zhang. 2014. Silencing in Apolygus lucorum of the olfactory coreceptor Orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals. Journal of Insect Physiology 60:31–39.
Zhu, J., L. Ban, L. M. Song, Y. Liu, P. Pelosi, and G. Wang. 2016. General odorant-binding proteins and sex pheromone guide larvae of Plutella xylostella to better food. Insect Biochemistry and Molecular Biology 72:10–19.
Zielonka, M., P. Gehrke, E. Badeke, S. Sachse, H. Breer, and J. Krieger. 2016. Larval sensilla of the moth Heliothis virescens respond to sex pheromone components. Insect Molecular Biology 25:666–678.

ANNEXES

Article 1: Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant Receptors.

frontiers in Behavioral Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 12 November 2018
doi: 10.3389/fnbeh.2018.00264

Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to *Spodoptera littoralis* Larval Odorant Receptors

*Arthur de Fouchier†, Xiao Sun†, Gabriela Caballero-Vidal, Solène Travaillard†, Emmanuelle Jacquin-Joly and Nicolas Montagné**

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Sorbonne Université, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Diderot, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Gérard Manière, Université de Bourgogne, France

Reviewed by:
Alisha Anderson, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Australia
Merid Negash Getahun, International Centre of Insect Physiology and Ecology, Kenya

***Correspondence:**
Nicolas Montagné
nicolas.montagne@sorbonne-universite.fr

† Present address:
Arthur de Fouchier, Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée (LEEC), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France
Xiao Sun, Biotic Interaction and Biosecurity Lab, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, China
Solène Travaillard, Aix-Marseille Université, CNRS, Institut de Biologie du Développement de Marseille, Marseille, France

Received: 12 June 2018
Accepted: 18 October 2018
Published: 12 November 2018

Citation:
de Fouchier A, Sun X, Caballero-Vidal G, Travaillard S, Jacquin-Joly E and Montagné N (2018) Behavioral Effect of Plant Volatiles Binding to Spodoptera littoralis Larval Odorant Receptors. Front. Behav. Neurosci. 12:264. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00264

Phytophagous insects use volatile organic compounds (VOC) emitted by plants to orient towards their hosts. In lepidopteran pests, crop damages are caused by larval stages—the caterpillars—that feed extensively on leaves or other plant tissues. However, larval host plant choice has been poorly studied, and it is generally admitted that caterpillars feed on the plant where the female laid the eggs. The mobility of caterpillars has been generally overlooked even though several studies showed that they can orient towards odors and change host plant. Recently, a large number of odorant receptors (ORs) tuned to plant volatiles have been characterized in the model pest moth *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). In the present work, we identified nine of these deorphanized ORs as expressed in *S. littoralis* caterpillars. In order to understand whether these ORs are involved in host searching, we tested the behavioral significance of their ligands using a larval two-choice assay. This OR-guided approach led to the identification of nine plant volatiles, namely 1-hexanol, benzyl alcohol, acetophenone, benzaldehyde, (Z)3-hexenol, (E)2-hexenol, indole, DMNT and (Z)3-hexenyl acetate, which are active on *S. littoralis* caterpillar behavior, increasing our knowledge on larval olfactory abilities. To further explore the link between OR activation and behavioral output induced by plant volatiles we used a modeling approach, thereby allowing identification of some ORs whose activation is related to caterpillar attraction. These ORs may be promising targets for future plant protection strategies.

Keywords: insect, olfaction, olfactory receptor, volatile organic compound, crop pest, caterpillar, Lepidoptera, Noctuidae

INTRODUCTION

Holometabolous insects are characterized by two mobile developmental stages with drastically different morphologies and physiologies. The larval stage constitutes a period of active feeding and growth, while the adult stage is a period devoted to reproduction and dispersal. Larvae and adults thus have different life styles, are not in competition for the same resources, and develop independent adaptations in response to different selective pressures. This distinction between adults and larvae is particularly striking in Lepidoptera. While larvae (or caterpillars) are actively feeding on their host plant, the adults generally live only a few days and feed on the nectar of flowers (Powell, 2009). Almost all plant species are damaged by caterpillars, many of which are pests of both crops and stored products (Stehr, 2009).

Host plant choice is a crucial task for phytophagous insects, and it is highly dependent on the sense of smell. The detection of plant-emitted volatile organic compounds (VOC) has been the subject of intense research, notably in crop pest insects (Bruce and Pickett, 2011; Bruce et al., 2015). In a number of lepidopteran pests, VOCs have been identified as attractants towards host plants, as repellents towards non-host or damaged plants or as oviposition stimulants (Saveer et al., 2012; Borrero-Echeverry et al., 2015). However, despite the impact of caterpillars on crop production, most studies focused on the adults and little is known about larval olfaction. A well-admitted theory, referred as "mother knows best," assumes a strong selective pressure for females to lay their eggs on the plant where the larvae will have the highest performance (Jaenike, 1978; Carrasco et al., 2015). However, in some species it has been demonstrated that the caterpillars can leave the plant on which they hatched to select another host plant (Soler et al., 2012; Gamberale-Stille et al., 2014). Consistently, caterpillars exhibit attraction or repulsion behaviors towards VOCs of ecological significance (Carroll and Berenbaum, 2002; Huang and Mack, 2002; Singh and Mullick, 2002; Carroll et al., 2006, 2008; Castrejon et al., 2006; Becher and Guerin, 2009; Mooney et al., 2009; Piesik et al., 2009; Poivet et al., 2012; Zhu et al., 2016; Di et al., 2017) and are even able to perform associative learning (Blackiston et al., 2008; Salloum et al., 2011). This indicates that olfaction may play a more prominent role than initially expected in host plant choice of caterpillars, which could lay foundation for the development of novel pesticide-free strategies for fighting against those insects.

The peripheral olfactory system of caterpillars is generally composed of three olfactory sensilla located on the antennae, and four to five olfactory sensilla located on the maxillary palps (Grimes and Neunzig, 1986; Laue, 2000; Vogt et al., 2002; Roessingh et al., 2007; Poivet et al., 2012; Zielonka et al., 2016). These sensilla house the olfactory sensory neurons that express transmembrane odorant receptor (OR) proteins, which bind odorants and allow signal transduction (Leal, 2013). The repertoires of ORs expressed in caterpillar tissues have been identified only in a few species, such as the silkworm *Bombyx mori* (Tanaka et al., 2009), the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Di et al., 2017) and the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Poivet et al., 2013). In this latter species, 15 ORs (further referred as SlitORs) tuned to plant VOCs have been recently deorphanized (de Fouchier et al., 2017), i.e., their ligands have been identified (**Supplementary Figure S1**). These VOCs are mainly short-chain alcohols, aldehydes or esters (also referred as green leaf volatiles, abundantly released from damaged leaves), aromatics and terpenes (most of them being ubiquitous odorants, present in high amounts in floral bouquets). However, the effect of these SlitOR ligands on the behavior of *S. littoralis* larvae remains largely unknown. Among them, only 1-hexanol (a green leaf volatile) has been shown to be attractive at high dose toward 2nd and 3rd-instar larvae (Rharrabe et al., 2014).

In the present work, we first re-examined the expression pattern of the 15 deorphanized SlitORs in adult and larvae olfactory organs, and identified nine as expressed at the larval stage. We then used a simple bioassay to carry out a systematic behavioral analysis of 14 VOCs previously identified as ligands of these nine SlitORs. Using this OR-guided approach, we found 1-hexanol, benzyl alcohol, acetophenone, benzaldehyde, (Z)3-hexenol, (E)2-hexenol, indole, DMNT and (Z)3-hexenyl acetate as active on the behavior of *S. littoralis* caterpillars, increasing our knowledge on larval olfactory abilities. Building on the results of these behavioral assays and on our previous knowledge of SlitOR response spectra (de Fouchier et al., 2017), we used a modeling approach in order to identify possible correlations between the activation of SlitORs and the behavioral response of caterpillars. By doing so, we highlighted ORs whose activation may be critical for larval attraction towards plant volatiles.

MATERIALS AND METHODS

Insects and Chemicals

S. littoralis larvae were reared on a semi-artificial diet (Poitout and Bues, 1974) at 22°C, 60% relative humidity and under a 16 h light: 8 h dark cycle. The panel of odorants tested was composed of 14 synthetic molecules (**Supplementary Table S1**) previously shown to be active on SlitORs expressed at the larval stage (de Fouchier et al., 2017). Odorants were diluted in paraffin oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), except indole that was diluted in hexane (Carlo-Erba Reagents, Val de Reuil, France). The odorants were used at concentrations of 100, 10, 1, 0.1 or 0.01 μg/μl.

RNA Isolation and Reverse-Transcription PCR

Fifty *S. littoralis* male and female adult antennae and 50 pairs of 4th-instar larvae antennae and maxillary palps were dissected and immediately placed in TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for total RNA extraction. After isolation using phenol-chloroform, RNA was purified using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), including a DNase I treatment. RNA purity and quantity were measured on a NanoDrop™ ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA synthesis was performed using 1 μg of total RNA as template, with the iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA). PCRs were performed using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Basel, Switzerland) under the following conditions: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 10 s), hybridization (58–62°C—depending on primer pairs—for 15 s) and elongation (72°C for 15 s). Primer pairs were designed from SlitOR nucleotide sequences using Primer3Plus[1]. All primer sequences, annealing temperatures and expected product sizes are listed in **Supplementary Table S2**. Orco, the obligatory OR co-receptor (Malpel et al., 2008; Leal, 2013), was used as control for the four tissues. For each amplification, negative controls consisted of amplifications run on DNase-treated RNAs and water templates. The amplification products were loaded on 1.5% agarose gels and visualized using GelRed™

[1]http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). Tissue dissections, RNA extractions and RT-PCR experiments were repeated three times at different periods, to serve as biological replicates.

Behavioral Experiments

Two-choice behavioral assays were performed using *S. littoralis* 3rd and 4th-instar larvae, starved for 16–22 h prior to experiments. The behavioral assay consisted in placing 10 caterpillars in the center of a Petri dish. Filter papers were placed at two opposite sides of the dish. One was loaded with 10 µl of an odorant solution and the other with 10 µl of the corresponding solvent. Each odorant concentration was tested 10–15 times. For each experiment, 10 Petri dishes (containing 10 different odorants) and one control dish with solvent on both sides were recorded during 15 min. In each dish, two zones were defined around the filter papers, an "odorant" zone and a "solvent" zone (the layout of the zones are visible in **Figure 1**). The number of caterpillars in each zone was counted 2.5, 5, 10 and 15 min after the beginning of the experiment.

Data Analysis and Modeling

For each time point, a preference index (PI) was calculated using the following formula:

$$PI = (N_{odorant} - N_{solvent})/(N_{total})$$

$N_{odorant}$ being the number of larvae in the odorant zone, $N_{solvent}$ being the number of larvae in the solvent zone and N_{total} being the total number of larvae in the assay. As this PI varies between −1 and 1, a positive value means that the odorant is attractive and a negative value indicates repellency. To test for the statistical significance of the observed PI, we compared the value to a theoretical value of 0 with a Wilcoxon two sided unpaired test using R (Package stats version 3.3.2).

In order to compare observed PIs with responses of the SlitORs (in spikes.s^{-1}) when expressed in the *Drosophila* empty neuron system (de Fouchier et al., 2017), we performed multiple linear regressions using the "step" and "lm" function of R (Package stats version 3.3.2). To obtain the most efficient equation, we performed stepwise linear regressions relating PI with all possible interactions between the larval SlitOR responses (SlitOR7, 14, 19, 24, 25, 27, 28, 29 and 31). As odorant stimulus quantities used in electrophysiology experiments cannot be directly related to quantities used in the present behavior experiments, we built models for different electrophysiology-behavior odorant quantity relationships (1:1, 1:1/10, 1:1/100 and 1:1/1,000). We selected the equation with the highest R^2 and refined it performing another stepwise multiple linear regression. This model relates the PI with all the interactions between the factors with an impact significantly different from zero ($Pr(>t)$ $p \leq 0.05$) in the previously selected model. To further simplify the model, we performed a last multiple linear regression relating PI with only additive interactions of the previously used variables.

We also built some models to further test the importance of the different SlitORs in predicting larval PI. One using all possible interactions between the responses of SlitOR14, 19, 28, 29 and 31, and four other models using linear regressions of the PI explained by the response from only SlitOR7, 24, 25 or 27.

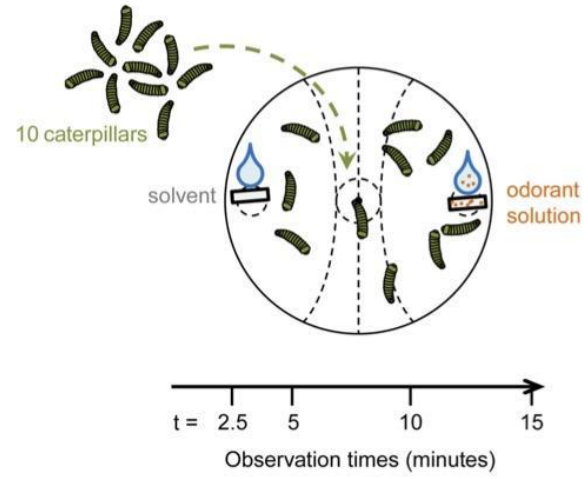


FIGURE 1 | Schematic of the behavior assay design. Ten 3rd and 4th-instar caterpillars were put in the center of a Petri dish after being starved for 16–22 h. On one side of the dish, a filter paper with 10 µl of an odorant solution was placed. Another filter paper with 10 µl of solvent was put at the opposite side of the dish. The numbers of caterpillars in the different zones were recorded at 2.5, 5, 10 and 15 min. The preference index (PI), ranging for 1 (attraction) to −1 (repulsion), was calculated for each observation time.

RESULTS

Expression of SlitORs at the Larval Stage

The expression pattern of 15 previously deorphanized SlitORs in male and female adult antennae, larval antennae and larval maxillary palps (4th-instar larvae) was re-investigated using RT-PCR. As found previously, all SlitORs were expressed in male and female antennae. Among them, nine SlitORs were also expressed in larval tissues (**Figure 2**). Five ORs were expressed in larval antennae (SlitOR14, 19, 24, 28 and 31), and four ORs were expressed in both larval antennae and maxillary palps (SlitOR7, 25, 27, 29). Altogether, these nine ORs were previously found to detect 20 plant VOCs (**Supplementary Figure S1**) among a panel of 50 molecules from different chemical classes, when expressed in the *Drosophila* empty neuron system (de Fouchier et al., 2017). We then selected a panel of 14 of these odorants, chosen based on the distinct OR activation patterns they elicit, in order to test their effect on larval behavior.

Behavior of *S. littoralis* Caterpillars Toward SlitOR Ligands

We assessed the valence of plant VOCs for *S. littoralis* caterpillars by describing their repartition in a two-choice

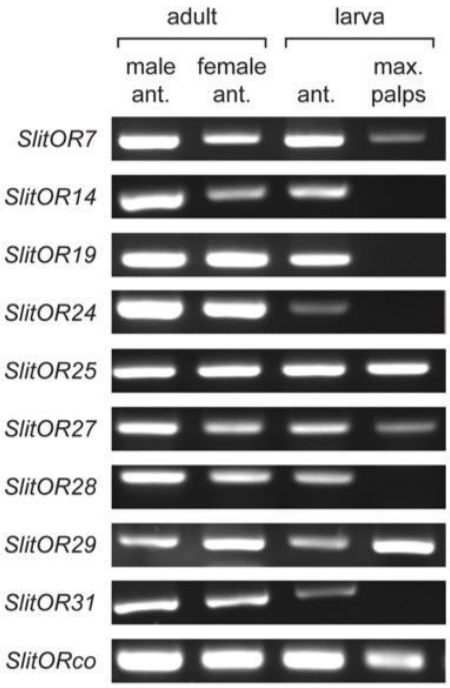


FIGURE 2 | Tissue-specific expression of larval *S. littoralis* odorant receptors (ORs) identified by RT-PCR. Each RT-PCR was repeated three times on three separate RNA extractions. Only SlitORs found to be expressed in larval antennae or maxillary palps in the three replicates are shown.

bioassay (**Figure 1**) using a PI over a period of 15 min. **Figure 2** reports the PIs measured at 2.5 min for the different VOCs at different doses. PIs measured for other time points are presented in **Supplementary Figure S2**. For 2-phenyl acetaldehyde, 1-indanone, (E)-ocimene and eugenol, we observed no significant attraction (PI $>$ 0) or repulsion (PI $<$ 0), at any dose and any time. Benzyl alcohol, acetophenone, benzaldehyde, indole, 1-hexanol, (Z)3-hexenol and (E)2-hexenol were attractive at least at one dose, with the highest PI measured at 2.5 min (**Figure 3**). 1-hexanol displayed the strongest attraction, with a mean PI of 0.50 at 100 μg, and 0.44 at 10 μg. Benzyl alcohol was attractive over the wider range of doses, from 100 down to 1 μg per filter paper. Benzaldehyde elicited attraction at 100 and 10 μg, and acetophenone only at 100 μg. Indole was attractive at 10 and 0.1 μg only and (E)2-hexenol was attractive only at 1 μg. For most of these VOCs, the PI tended to decrease over time (**Supplementary Figure S2**), which suggests that sensory adaptation occurred. The only stimulus that remained attractive over time was acetophenone, when presented at the highest dose (100 μg). (Z)3-hexenyl acetate differed from the previous VOCs as doses of 100 and 10 μg were found to be attractive after 5 min of experiment, and not after 2.5 min (**Supplementary Figure S2**).

At 2.5 min, benzaldehyde (at 0.1 μg) was the only VOC found to be repulsive (**Figure 3**). (Z)3-hexenyl acetate (1 μg) was repulsive after 5 min, and (E)2-hexenal and DMNT also induced a negative PI (for 0.1 and 100 μg, respectively) at 15 min of observation (**Supplementary Figure S2**).

Modeling of the Relationship Between SlitOR Activation and Behavioral Activity Induced by Their Ligands

We next aimed to identify which of the SlitORs could be linked to attraction or repulsion towards plant VOCs. To assess the correlation between the valence of odorants and their activation pattern of ORs, we built models relating caterpillar PIs measured here with larval SlitOR responses to the same odorants (previously characterized in de Fouchier et al., 2017). We used stepwise multiple linear regressions, taking into account all possible interactions between the variables. The equations of the first models built are available in **Supplementary Datasheet 2**. The multiple linear regression giving the highest adjusted R^2 (0.6861) was the one using a 1:1 relationship between quantities used in behavior and electrophysiology experiments (**Table 1**).

To identify the SlitORs whose activation is the most critical to the valence of plant odorants for caterpillars, we refined the equation of the 1:1 model. For this, we performed stepwise multiple linear regressions taking into account all possible interactions between the factors with an effect significantly different from zero in the 1:1 model ($\Pr(>t)$ $p \leq 0.05$). This model was able to describe the variation of PIs from the responses of 5 SlitORs (SlitOR7, 14, 24, 25 and 27; F-Test, $p \leq 0.001$, $R^2 = 0.6366$, **Table 1**, **Figure 4A** and **Supplementary Figure S3**). The equation of the refined model is given in **Supplementary Datasheet 2**. The intercept value of this model was not different from 0 ($\Pr(>t)$ $p \geq 0.05$), which predicts that an absence of SlitOR activation would result in an absence of behavioral output. In this refined model, activation of SlitOR24 was predicted to have a positive effect by itself on PIs ($\Pr(>t)$ $p \leq 0.05$), whereas activations of SlitOR7, 25 and 27 were predicted to have an

TABLE 1 | SlitOR/behavior multiple linear regression model statistics.

Model	Adjusted R^2	Residual standard error	*F*-test	Shapiro test
Model 1:1	0.6861	0.09647	***	***
Model 1:1/10	0.6225	0.1048	***	NS
Model 1:1/100	0.5795	0.1106	***	*
Model 1:1/1000	0.3061	0.142	***	NS
Refined 1:1 model	0.6366	0.1038	***	**
Minimal 1:1 model	0.6115	0.1073	***	NS

*Statistics associated with the models of S. littoralis caterpillars PIs. The Shapiro Test column indicates the p-value of a normality test for the distribution of the model residuals. ***$p \leq 0.001$, **$p \leq 0.01$, *$p \leq 0.05$, NS: $p > 0.05$.*

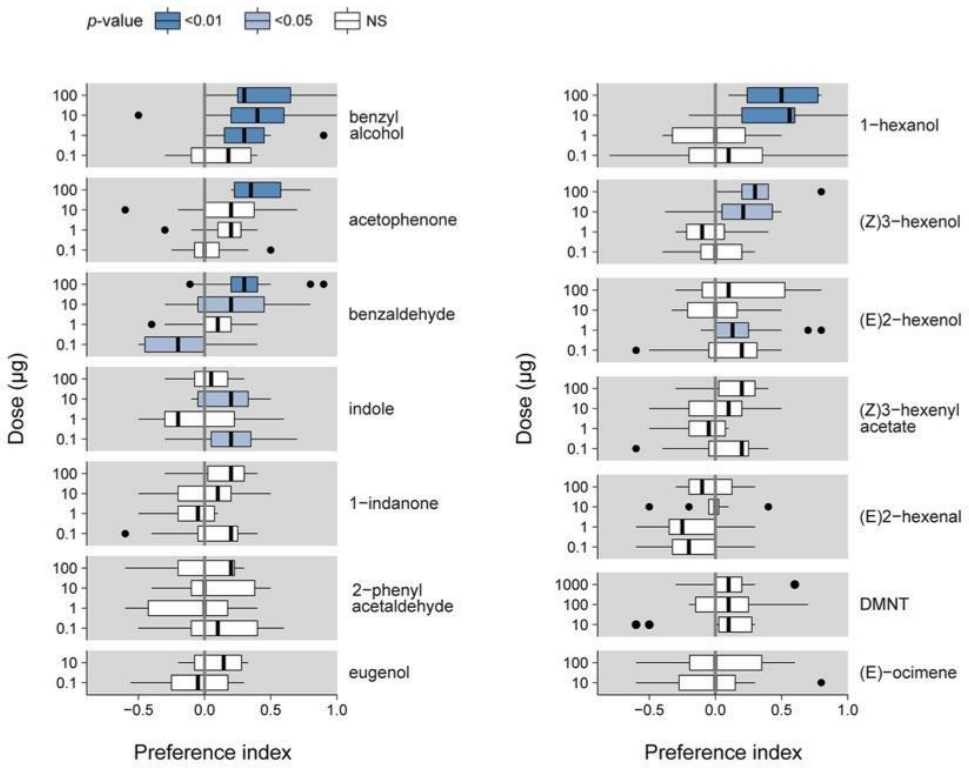


FIGURE 3 | *S. littoralis* larval PI measured 2.5 min after exposure to different odorant stimuli. Box plots show the median PI and the 25th and 75th percentiles (n = 8–15). Outliers are indicated with black dots. p-values are indicated using a color code (Wilcoxon test).

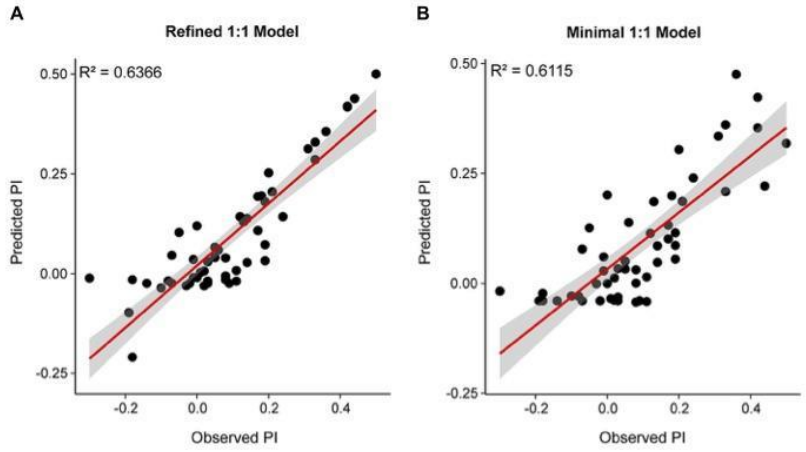


FIGURE 4 | Predicted PI plotted as a function of the observed PI for the refined **(A)** and minimal models **(B)**. Red lines depict the linear trend while the overlaying gray band is the SE for the fit.

effect on PIs only through OR co-activation. SlitOR14 associated coefficients were not different from 0 ($\Pr(>t)$ $p \geq 0.05$).

As the refined model had a complicated equation (20 terms), we then built a simpler model to predict the behavior using only additive interactions. The equation of this minimal model is:

$$PI = a + b \times SlitOR7 + c \times SlitOR24 + d \times SlitOR25 + e \times SlitOR27$$

with *SlitORx* as the ORx responses to the considered odorant in spikes.s^{-1} and *a-e* as coefficients. The values of these coefficients (available in **Supplementary Datasheet 2**) were all different from 0 ($\Pr(>t)$ $p \leq 0.05$), except for the intercept. The R^2 value for this model was 0.6115 (**Table 1**, **Figure 4B** and **Supplementary Figure S3**), which is comparable to the performances of the refined 1:1 model. SlitOR24 had the highest coefficient (2.6070×10^{-3}, $p \leq 0.001$), which further supports a link between this receptor and neuronal circuits driving attraction in *S. littoralis* larvae. It is interesting to note that the coefficient associated with SlitOR7 was negative ($-5.0528 \times 10^{-3}, p \leq 0.05$). This predicts that activation of SlitOR7 has a negative effect of the PI of *S. littoralis* caterpillars.

To further confirm the importance of those four SlitORs for models performance in predicting the observed PI, we tried to build a model using all interactions between all the SlitORs except SlitOR7, 24, 25 and 27. The stepwise multiple linear regressions method was unable to produce a model from these variables, thus highlighting the importance of these receptors for the response of caterpillars to the VOCs tested. We also built models using the responses from only SlitOR7, 24, 25 or 27. The R^2 values for these models were respectively: 0.15, 0.48, 0.19 and 0.04. The values of the coefficients of the intercept and of the SlitOR response were different from 0 ($\Pr(>t)$ $p \leq 0.05$), except for the intercept of the model based on SlitOR24. These observations support that SlitOR24 is the most important receptor to predict the PI observed for the plant volatiles we tested.

DISCUSSION

Building upon the previous identification of ligands for a large number of *S. littoralis* ORs, we aimed at identifying behaviorally active odorants for caterpillars, which are pests feeding on a wide range of plants, notably economically important ones (Salama et al., 1971; Cabello, 1989; Thöming et al., 2013; von Mérey et al., 2013; Proffit et al., 2015). Nine *S. littoralis* ORs were confirmed to be expressed in larval chemosensory organs, namely the antennae and the maxillary palps. Our "OR-guided" strategy, by which we tested molecules active on these larval SlitORs, appeared as a good strategy as we could identify plant VOCs being behaviorally active when presented alone, most of them being attractive to caterpillars. Following that work, it will be of interest to test the effect of blends of these VOCs. It has been shown in *H. armigera* that a mixture of the best ligands of four ORs was the most attractive stimulus for first-instar larvae (Di et al., 2017), and one would expect that the same holds true for *S. littoralis*.

Our study complements a former study (Rharrabe et al., 2014) that investigated 11 odorants commonly emitted by plants, identifying only a small part of them as behaviorally active. In this previous work, eugenol was found to be repellent and 1-hexanol attractive. Here, attraction towards 1-hexanol could be reproduced in our assay but eugenol was inactive. This discrepancy could be explained by the fact that odorants and controls were presented together with food pellets in the aforementioned study while we used only filter papers as odor source. Hence, it is likely that repellent VOCs for *S. littoralis* caterpillars may be identified only when given the choice between food sources (or food odors) with or without the VOC.

Another interesting difference between these two types of behavioral assays is that the presence of food will make the larvae stay on the food source once they have made a choice. In our experiments, larvae resumed foraging after their initial choice, which enabled to observe a decrease of the PI in most cases, likely due to sensory adaptation. Another possible explanation for this PI decrease would be that the volume of the Petri dish has been rapidly saturated with the odor, leading to a loss of the odor gradient necessary for larval orientation.

A similar OR-guided approach was recently used on another species of pest caterpillars, *H. armigera*, and led to the identification of several OR ligands that were active on the behavior of first-instar larvae (Di et al., 2017). Even if *S. littoralis* and *H. armigera* both belong to the same family (Noctuidae) and are both highly polyphagous herbivores, their larval OR repertoires seem to differ drastically. Indeed, the orthologs of only three of the nine larval SlitORs were also found to be expressed in *H. armigera* larvae (Di et al., 2017). The same holds true when comparing with the more distantly related species *B. mori* (Tanaka et al., 2009). Accordingly, a limited number of odorants identified as active on *S. littoralis* larvae are also active on other species, and vice versa.

The most attractive VOC (i.e., with the highest PI) was 1-hexanol, an ubiquitous plant volatile (Knudsen et al., 2006), which has been observed to be attractive for caterpillars of the Tortricidae *Lobesia botrana* (Becher and Guerin, 2009). Among other attractive compounds for *S. littoralis* larvae, (Z)3-hexenol was also observed to be attractive to *L. botrana* and *H. armigera* (Di et al., 2017), but not to *B. mori* (Tanaka et al., 2009). (Z)3-hexenyl acetate is a volatile released by plants that suffered attacks from insects and it has been reported to serve as a chemical message between plants (Frost et al., 2008; Helms et al., 2014). It has been observed to be attractive for the larvae of *S. littoralis* (this study), *H. armigera*, *L. botrana*, and *B. mori*. This suggests that (Z)3-hexenyl acetate is an important cue for a large spectrum of lepidopteran species. However, at a lower dose (1 μg), it is also the most repulsive VOC for *S. littoralis* caterpillars. Further experiments specially designed for the identification of repellents would be necessary to confirm this repulsive effect, but *S. littoralis* might use (Z)3-hexenyl acetate to detect and avoid damaged plants. Indeed, it has been demonstrated previously that *S. littoralis* larvae are able to discriminate between different leaves of a host plant and show a preference for young leaves, this preference being modified by herbivore damage (Anderson and Agrell, 2005). (Z)3-hexenyl acetate is detected via the activation of several ORs (de Fouchier et al., 2017). Their differential activation pattern relative to the dose may encode the concentration, as previously hypothesized for pheromone receptors detecting the same pheromone component in adults (de Fouchier et al., 2015).

From the comparison of behavior results with our previous results on SlitOR deorphanization (de Fouchier et al., 2017), we built models that can predict PI values for odorants based on their OR activation pattern. Results of this modeling approach suggest that larval attraction depends on the activation of a

particular subset of ORs (i.e., circuit-based) rather than on the summed response of the entire OR repertoire. This will be possible to confirm this hypothesis only when the complete larval OR repertoire will be characterized. In *D. melanogaster*, similar linear regression-based approaches allowed to predict larval behavior from the responses of only five ORs (Kreher et al., 2008). Still in *D. melanogaster*, a strong link has been identified between larval attraction and activation of two larval ORs, DmelOR42a and DmelOR42b (Kreher et al., 2008; Asahina et al., 2009; Grewal et al., 2014). Here, models supported that SlitOR24, 25 and 27 are involved in pro-attraction neuronal circuits, while SlitOR7 activation would antagonize attraction. Activation of the first three receptors, especially SlitOR24, seems to be sufficient to trigger attraction of *S. littoralis* toward different concentrations of odorants. This will need further experimental validation, notably by identifying new ligands for these receptors and testing their behavioral effect, but it could be a promising way to identify new compounds that could impact the behavior of this important crop pest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AF, EJ-J and NM designed the study. AF, XS and ST performed behavioral experiments. GC-V performed molecular biology experiments. AF performed modeling experiments. AF, EJ-J and NM wrote the manuscript, with input from all authors.

FUNDING

This work has been funded by Inra, Sorbonne Université and the French National Research Agency (ANR-16-CE21-0002-01 and ANR-16-CE02-0003-01). AF and GC-V received doctoral fellowships from Inra and the National Council of Science and Technology of Paraguay, respectively. XS received a grant from the China Scholarship Council (CSC).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Christelle Monsempes, Marie-Christine François and Françoise Bozzolan for their help with molecular biology experiments and Matthieu Dacher for his help with data modeling.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2018.00264/full#supplementary-material

REFERENCES

Anderson, P., and Agrell, J. (2005). Within-plant variation in induced defense in developing leaves of cotton plants. *Oecologia* 144, 427–434. doi: 10.1007/s00442-005-0095-3

Asahina, K., Louis, M., Piccinotti, S., and Vosshall, L. B. (2009). A circuit supporting concentration-invariant odor perception in *Drosophila*. *J. Biol.* 8:9. doi: 10.1186/jbiol108

Becher, P. G., and Guerin, P. M. (2009). Oriented responses of grapevine moth larvae *Lobesia botrana* to volatiles from host plants and an artificial diet on a locomotion compensator. *J. Insect Physiol.* 55, 384–393. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.006

Blackiston, D. J., Casey, E. S., and Weiss, M. R. (2008). Retention of memory through metamorphosis: can a moth remember what it learned as a caterpillar? *PLoS One* 3:e1736. doi: 10.1371/journal.pone.0001736

Borrero-Echeverry, F., Becher, P. G., Birgersson, G., Bengtsson, M., Witzgall, P., and Saveer, A. M. (2015). Flight attraction of *Spodoptera littoralis (Lepidoptera, Noctuidae)* to cotton headspace and synthetic volatile blends. *Front. Ecol. Evol.* 3:56. doi: 10.3389/fevo.2015.00056

Bruce, T. J. A., Aradottir, G. I., Smart, L. E., Martin, J. L., Caulfield, J. C., Doherty, A., et al. (2015). The first crop plant genetically engineered to release an insect pheromone for defense. *Sci. Rep.* 5:11183. doi: 10.1038/srep11183

Bruce, T. J. A., and Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. *Phytochemistry* 72, 1605–1611. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.04.011

Cabello, T. (1989). Natural enemies of noctuid pests *(Lep., Noctuidae)* on alfalfa, corn, cotton and soybean crops in southern Spain. *J. Appl. Entomol.* 108, 80–88. doi: 10.1111/j.1439-0418.1989.tb00436.x

Carrasco, D., Larsson, M. C., and Anderson, P. (2015). Insect host plant selection in complex environments. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 1–7. doi: 10.1016/j.cois.2015.01.014

Carroll, M. J., and Berenbaum, M. R. (2002). Behavioral responses of the parsnip webworm to host plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 28, 2191–2201. doi: 10.1023/A:1021093114663

Carroll, M. J., Schmelz, E. A., Meagher, R. L., and Teal, P. E. A. (2006). Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *J. Chem. Ecol.* 32, 1911–1924. doi: 10.1007/s10886-006-9117-9

Carroll, M. J., Schmelz, E. A., and Teal, P. E. A. (2008). The attraction of *Spodoptera frugiperda* neonates to cowpea seedlings is mediated by volatiles induced by conspecific herbivory and the elicitor inceptin. *J. Chem. Ecol.* 34, 291–300. doi: 10.1007/s10886-007-9414-y

Castrejon, F., Virgen, A., and Rojas, J. C. (2006). Influence of chemical cues from host plants on the behavior of neonate *Estigmene acrea* larvae (Lepidoptera: Arctiidae). *Environ. Entomol.* 35, 700–707. doi: 10.1603/0046-225x-35.3.700

de Fouchier, A., Sun, X., Monsempes, C., Mirabeau, O., Jacquin-Joly, E., and Montagné, N. (2015). Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus *Spodoptera*. *Front. Ecol. Evol.* 3:95. doi: 10.3389/fevo.2015.00095

de Fouchier, A., Walker, W. B., Montagné, N., Steiner, C., Binyameen, M., Schlyter, F., et al. (2017). Functional evolution of *Lepidoptera* olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nat. Commun.* 8:15709. doi: 10.1038/ncomms15709

Di, C., Ning, C., Huang, L. Q., and Wang, C. Z. (2017). Design of larval chemical attractants based on odorant response spectra of odorant receptors in the cotton bollworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 84, 48–62. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.03.007

Frost, C. J., Mescher, M. C., Dervinis, C., Davis, J. M., Carlson, J. E., and De Moraes, C. M. (2008). Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytol.* 180, 722–734. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02599.x

Gamberale-Stille, G., Söderlind, L., Janz, N., and Nylin, S. (2014). Host plant choice in the comma butterfly-larval choosiness may ameliorate effects of indiscriminate oviposition. *Insect Sci.* 21, 499–506. doi: 10.1111/1744-7917.12059

Grewal, J. S., Nguyen, C., Robles, R., Cho, C., Kir, K., Fledderman, N., et al. (2014). Complex and non-redundant signals from individual odor receptors that underlie chemotaxis behavior in *Drosophila melanogaster* larvae. *Biol. Open* 3, 947–957. doi: 10.1242/bio.20148573

Grimes, L. R., and Neunzig, H. H. (1986). Morphological survey of the maxillae in last-stage larvae of the suborder Ditrysia (Lepidoptera): mesal lobes (Laciniogaleae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 510–526. doi: 10.1093/aesa/79.3.510

Helms, A. M., De Moraes, C. M., Mescher, M. C., and Tooker, J. F. (2014). The volatile emission of *Eurosta solidaginis* primes herbivore-induced volatile

production in *Solidago altissima* and does not directly deter insect feeding. *BMC Plant Biol.* 14:173. doi: 10.1186/1471-2229-14-173

Huang, X. P., and Mack, T. P. (2002). Collection and determination of lesser cornstalk borer *(Lepidoptera: Pyralidae)* larval attractant from peanut plants. *Environ. Entomol.* 31, 15–21. doi: 10.1603/0046-225x-31.1.15

Jaenike, J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theor. Popul. Biol.* 14, 350–356. doi: 10.1016/0040-5809(78)90012-6

Knudsen, J., Eriksson, R., Gershenzon, J., and Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *Bot. Rev.* 72, 1–120. doi: 10.1663/0006-8101(2006)72[1:dadofs]2.0.co;2

Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J., and Carlson, J. R. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron* 59, 110–124. doi: 10.1016/j.neuron.2008.06.010

Laue, M. (2000). Immunolocalization of general odorant-binding protein in antennal sensilla of moth caterpillars. *Arthropod Struct. Dev.* 29, 57–73. doi: 10.1016/s1467-8039(00)00013-x

Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 373–391. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153635

Malpel, S., Merlin, C., François, M. C., and Jacquin-Joly, E. (2008). Molecular identification and characterization of two new *Lepidoptera* chemoreceptors belonging to the *Drosophila melanogaster* OR83b family. *Insect Mol. Biol.* 17, 587–596. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00830.x

Mooney, A. C., Robertson, H. M., and Wanner, K. W. (2009). Neonate silkworm (*Bombyx mori*) larvae are attracted to mulberry (*Morus alba*) leaves with conspecific feeding damage. *J. Chem. Ecol.* 35, 552–559. doi: 10.1007/s10886-009-9639-z

Piesik, D., Rochat, D., van der Pers, J., and Marion-Poll, F. (2009). Pulsed odors from maize or spinach elicit orientation in European corn borer neonate larvae. *J. Chem. Ecol.* 35, 1032–1042. doi: 10.1007/s10886-009-9676-7

Poitout, S., and Bues, R. (1974). Rearing larvae of twenty eight species of Noctuidae and two species of Arctiidae *(Lepidoptera)* on a simple artificial diet. Breeding peculiarities according to the different species. *Annales de Zoologie Ecologie Animale* Available online at: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ19750006946.

Poivet, E., Gallot, A., Montagné, N., Glaser, N., Legeai, F., and Jacquin-Joly, E. (2013). A comparison of the olfactory gene repertoires of adults and larvae in the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *PLoS One* 8:e60263. doi: 10.1371/journal.pone.0060263

Poivet, E., Rharrabe, K., Monsempes, C., Glaser, N., Rochat, D., Renou, M., et al. (2012). The use of the sex pheromone as an evolutionary solution to food source selection in caterpillars. *Nat. Commun.* 3:1047. doi: 10.1038/ncomms2050

Powell, J. A. (2009). "Lepidoptera: moths, butterflies," in *Encyclopedia of Insects*, 2nd Edn., eds V. H. Resh and R. T. Cardé (Amsterdam: Elsevier), 559–587. doi: 10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X

Proffit, M., Khallaf, M. A., Carrasco, D., Larsson, M. C., and Anderson, P. (2015). "Do you remember the first time?" Host plant preference in a moth is modulated by experiences during larval feeding and adult mating. *Ecol. Lett.* 18, 365–374. doi: 10.1111/ele.12419

Rharrabe, K., Jacquin-Joly, E., and Marion-Poll, F. (2014). Electrophysiological and behavioral responses of *Spodoptera littoralis* caterpillars to attractive and repellent plant volatiles. *Front. Ecol. Evol.* 2:5. doi: 10.3389/fevo.2014.00005

Roessingh, P., Xu, S., and Menken, S. B. J. (2007). Olfactory receptors on the maxillary palps of small ermine moth larvae: evolutionary history of benzaldehyde sensitivity. *J. Comp. Physiol. A* 193, 635–647. doi: 10.1007/s00359-007-0218-x

Salama, H. S., Dimetry, N. Z., and Salem, S. A. (1971). On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* 67, 261–266. doi: 10.1111/j.1439-0418.1971.tb02122.x

Salloum, A., Colson, V., and Marion-Poll, F. (2011). Appetitive and aversive learning in *Spodoptera littoralis* larvae. *Chem. Senses* 36, 725–731. doi: 10.1093/chemse/bjr041

Saveer, A. M., Kromann, S. H., Birgersson, G., Bengtsson, M., Lindblom, T., Balkenius, A., et al. (2012). Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. *Proc. Biol. Sci.* 279, 2314–2322. doi: 10.1098/rspb.2011.2710

Singh, A. K., and Mullick, S. (2002). Leaf volatiles as attractants for neonate *Helicoverpa armigera* Hbn. *(Lep., Noctuidae)* larvae. *J. Appl. Entomol.* 126, 14–19. doi: 10.1046/j.1439-0418.2002.00600.x

Soler, R., Pineda, A., Li, Y., Ponzio, C., van Loon, J. J. A., Weldegergis, B. T., et al. (2012). Neonates know better than their mothers when selecting a host plant. *Oikos* 121, 1923–1934. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20415.x

Stehr, F. W. (2009). "Caterpillars," in *Encyclopedia of Insects* 2nd Edn., eds V. H. Resh and R. T. Cardé, (Amsterdam: Elsevier), 135–137. doi: 10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X

Tanaka, K., Uda, Y., Ono, Y., Nakagawa, T., Suwa, M., Yamaoka, R., et al. (2009). Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile. *Curr. Biol.* 19, 881–890. doi: 10.1016/j.cub.2009.04.035

Thöming, G., Larsson, M. C., Hansson, B. S., and Anderson, P. (2013). Comparison of plant preference hierarchies of male and female moths and the impact of larval rearing hosts. *Ecology* 94, 1744–1752. doi: 10.1890/12-0907.1

Vogt, R. G., Rogers, M. E., Franco, M., and Sun, M. (2002). A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta (Lepidoptera)* and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *J. Exp. Biol.* 205, 719–744.

von Mérey, G. E., Veyrat, N., D'Alessandro, M., and Turlings, T. C. J. (2013). Herbivore-induced maize leaf volatiles affect attraction and feeding behavior of *Spodoptera littoralis* caterpillars. *Front. Plant Sci.* 4:209. doi: 10.3389/fpls.2013.00209

Zhu, J., Ban, L., Song, L.-M. M., Liu, Y., Pelosi, P., and Wang, G. (2016). General odorant-binding proteins and sex pheromone guide larvae of *Plutella xylostella* to better food. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 72, 10–19. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.03.005

Zielonka, M., Gehrke, P., Badeke, E., Sachse, S., Breer, H., and Krieger, J. (2016). Larval sensilla of the moth *Heliothis virescens* respond to sex pheromone components. *Insect Mol. Biol.* 25, 666–678. doi: 10.1111/imb.12253

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 de Fouchier, Sun, Caballero-Vidal, Travaillard, Jacquin-Joly and Montagné. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 2: A novel subfamily of putative moth pheromone receptors revealed by functional characterization in Spodoptera littoralis.

eLIFE elifesciences.org

RESEARCH ARTICLE

A novel lineage of candidate pheromone receptors for sex communication in moths

Lucie Bastin-Héline[1], Arthur de Fouchier[1†], Song Cao[2], Fotini Koutroumpa[1], Gabriela Caballero-Vidal[1], Stefania Robakiewicz[1], Christelle Monsempes[1], Marie-Christine François[1], Tatiana Ribeyre[1], Annick Maria[1], Thomas Chertemps[1], Anne de Cian[3], William B Walker III[4], Guirong Wang[2]*, Emmanuelle Jacquin-Joly[1]*, Nicolas Montagné[1]*

[1]Sorbonne Université, Inra, CNRS, IRD, UPEC, Université Paris Diderot, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France; [2]State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China; [3]CNRS UMR 7196, INSERM U1154, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France; [4]Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden

Abstract Sex pheromone receptors (PRs) are key players in chemical communication between mating partners in insects. In the highly diversified insect order Lepidoptera, male PRs tuned to female-emitted type I pheromones (which make up the vast majority of pheromones identified) form a dedicated subfamily of odorant receptors (ORs). Here, using a combination of heterologous expression and in vivo genome editing methods, we bring functional evidence that at least one moth PR does not belong to this subfamily but to a distantly related OR lineage. This PR, identified in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*, is highly expressed in male antennae and is specifically tuned to the major sex pheromone component emitted by females. Together with a comprehensive phylogenetic analysis of moth ORs, our functional data suggest two independent apparitions of PRs tuned to type I pheromones in Lepidoptera, opening up a new path for studying the evolution of moth pheromone communication.

***For correspondence:** wangguirong@caas.cn (GW); emmanuelle.joly@inra.fr (EJ-J); nicolas.montagne@sorbonne-universite.fr (NM)

Present address: †Laboratoire d'Ethologie Expérimentale et Comparée (LEEC), Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

Competing interest: See page 13

Funding: See page 14

Received: 01 July 2019
Accepted: 01 November 2019
Published: 10 December 2019

Reviewing editor: Kristin Scott, University of California, Berkeley, United States

© Copyright Bastin-Héline et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

The use of pheromone signals for mate recognition is widespread in animals, and changes in sex pheromone communication are expected to play a major role in the rise of reproductive barriers and the emergence of new species (***Smadja and Butlin, 2009***). Since the first chemical identification of such a pheromone in *Bombyx mori* (***Butenandt et al., 1959***), moths (Insecta, Lepidoptera) have been a preferred taxon for pheromone research (***Cardé and Haynes, 2004***; ***Kaissling, 2014***). The diversification of pheromone signals has likely played a prominent role in the extensive radiation observed in Lepidoptera, which represents almost 10% of the total described species of living organisms (***Stork, 2018***).

Female moths generally release a species-specific blend of volatile molecules, which attract males over a long distance (***Cardé and Haynes, 2004***). Four types of sex pheromones have been described in moths (types 0, I, II and III), with distinct chemical structures and biosynthetic pathways (***Löfstedt et al., 2016***). 75% of all known moth sex pheromone compounds belong to type I and are straight-chain acetates, alcohols or aldehydes with 10 to 18 carbon atoms (***Ando et al., 2004***). Type I pheromones have been found in most moth families investigated, whereas the other types are restricted to only a few families (***Löfstedt et al., 2016***).

eLife digest Many animals make use of chemical signals to communicate with other members of their species. Such chemical signals, called pheromones, often allow males and females of the same species to recognize each other before mating. Since the discovery of the very first pheromone in the silkworm moth *Bombyx mori* at the end of the 1950s, moths have been a model for pheromone research. The sex pheromone communication system in these insects has thus been well described: females emit a mixture of volatile chemicals, which can be detected by the antennae of males up to several hundred meters away. This detection is achieved through neurons with specialized proteins known as pheromone receptors that bind to the chemical signals produced by the females.

Recognizing mates by detecting a very specific pheromone signature prevents moths from interbreeding with other species. The evolution of pheromone signals and their corresponding receptors can therefore lead to the rise of new reproductive barriers between populations, and eventually to the emergence of new species. The rate at which sex pheromones have diversified is likely one reason for the existence of over 160,000 species of moths. But how did moths' sex pheromone receptors evolve in the first place?

Previous studies suggested that moth pheromone receptors had appeared just once during evolution. Specifically, they revealed that these receptors belong to the same branch or lineage in the 'family tree' of all receptors that detect chemical compounds in moths. This meant that when researchers looked for pheromone receptors in a new species of moth, they always focused on this lineage. But Bastin-Héline et al. have now found that one pheromone receptor from a pest moth called *Spodoptera littoralis* does not belong to this established group.

First, Bastin-Héline et al. inserted this receptor into animal cells grown in the laboratory to confirm that it responds to a specific pheromone produced by *S. littoralis*. Next, they genetically modified moths of this species and showed that males need this receptor in order to mate. An evolutionary analysis showed that the receptor belongs to a different lineage than all the other known pheromone receptors. Together these results indicate the receptors for sex pheromones must have evolved multiple times independently in moths.

These results will open new avenues for deciphering pheromone communication in moths, and lead to further research into this newly discovered lineage of candidate pheromone receptors. Such studies may foster the development of new strategies to control agricultural pests, given that some species of moths can have devastating effects on the yields of certain crops.

In moth male antennae, pheromone compounds are detected by dedicated populations of olfactory sensory neurons (OSNs). Each type of OSN usually expresses one pheromone receptor (PR) responsible for signal transduction. PRs are 7-transmembrane domain proteins belonging to the odorant receptor (OR) family and, as ORs, are co-expressed in OSNs together with the conserved co-receptor Orco (**Chertemps, 2017**; **Fleischer and Krieger, 2018**).

Since the first discovery of moth PRs (**Krieger et al., 2004**; **Sakurai et al., 2004**), numerous pheromone receptors tuned to type I pheromone compounds have been characterized through different hererologous expression systems, and most appeared to be specific to only one compound (**Zhang and Löfstedt, 2015**). More recently, a few receptors tuned to type 0 and type II pheromones have also been characterized (**Zhang et al., 2016**; **Yuvaraj et al., 2017**). Type I PRs belong to a dedicated monophyletic subfamily of ORs, the so-called 'PR clade', suggesting a unique emergence early in the evolution of Lepidoptera (**Yuvaraj et al., 2018**). Another hallmark of type I PRs is their male-biased expression (**Koenig et al., 2015**). The phylogenetic position and the expression pattern have thus been the main criteria used to select candidate PRs for functional studies.

Likewise, we selected PRs from the male transcriptome of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (**Legeai et al., 2011**), a polyphagous crop pest that uses type I sex pheromone compounds (**Muñoz et al., 2008**) and that has been established as a model in insect chemical ecology (**Ljungberg et al., 1993**; **Binyameen et al., 2012**; **Saveer et al., 2012**; **Poivet et al., 2012**; **de Fouchier et al., 2017**). Through heterologous expression, we characterized two PRs tuned to minor components of the *S. littoralis* pheromone blend (**Montagné et al., 2012**; **de Fouchier et al., 2015**), but none of the tested candidate PRs detected the major pheromone component (*Z,E*)-9,11-

tetradecadienyl acetate (hereafter referred as (*Z,E*)-9,11-14:OAc), which is necessary and sufficient to elicit all steps of the male mate-seeking behavioral sequence (***Quero et al., 1996***).

In order to identify new type I PR candidates, we focused on male-biased ORs, whether they belong to the PR clade or not. Notably, a preliminary analysis of *S. littoralis* OR expression patterns led to the identification of such a receptor, SlitOR5, which was highly expressed in male antennae but did not belong to the PR clade (***Legeai et al., 2011***). Furthermore, a recent RNAseq analysis showed that SlitOR5 was the most abundant OR in *S. littoralis* male antennae (***Walker et al., 2019***). Here, we demonstrate that SlitOR5 is the receptor for (*Z,E*)-9,11-14:OAc using a combination of heterologous expression and in vivo genome editing methods. Based on a comprehensive phylogenetic analysis of lepidopteran ORs, we show that SlitOR5 belongs to an OR subfamily that is distantly related to the PR clade but harbors numerous sex-biased ORs from distinct moth families. Altogether, these results suggest that PRs detecting type I pheromones evolved at least twice in Lepidoptera, which offers a more detailed and complex panorama on moth PR evolution.

Results

SlitOr5 is highly expressed in males but does not belong to the type I pheromone receptor clade

We first used quantitative real-time PCR to compare the relative expression levels of the *SlitOr5* gene in *S. littoralis* male and female adult antennae. We found *SlitOr5* expressed with a more than

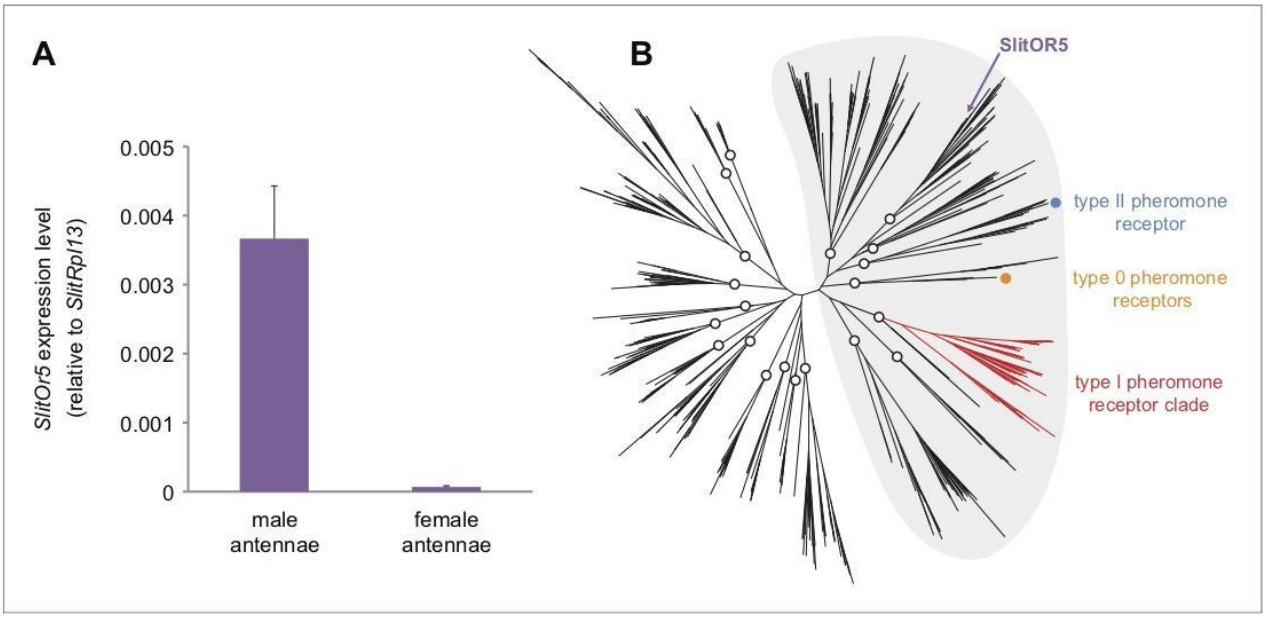


Figure 1. *SlitOr5* is highly expressed in males but does not belong to the pheromone receptor clade. (**A**) Expression levels of *SlitOr5* in adult male and female antennae of *S. littoralis*, as measured by real-time qPCR. Expression levels have been normalized to the expression of *SlitRpl13*. Plotted values represent the mean normalized expression values ± SEM ($n = 3$). Raw results are available in ***Figure 1—source data 1***. (**B**) Unrooted maximum likelihood phylogeny of lepidopteran ORs, based on 506 amino acid sequences from nine species, each belonging to a different superfamily. The position of SlitOR5 and of receptors for type 0, type I and type II pheromone compounds is highlighted. Circles on the nodes indicate the distinct paralogous OR lineages, supported by a transfer bootstrap expectation (TBE) >0.9. All the PR-containing lineages grouped within a large clade (highlighted in grey) also supported by the bootstrap analysis. The sequence alignment file is available in ***Figure 1—source data 2***.
The online version of this article includes the following source data for figure 1:

Source data 1. Mean normalized expression values of *SlitOr5* measured in the three biological replicates.
Source data 2. Alignment of amino acid sequences used to build the phylogeny (FASTA format).

50-fold enrichment in the male antennae (**Figure 1A**), thus confirming previous observations (**Legeai et al., 2011**; **Walker et al., 2019**).

We reconstructed a maximum likelihood phylogeny of lepidopteran ORs, based on entire OR repertoires from nine different species. Among the 20 paralogous lineages identified (each having evolved in principle from an ancestral OR present in the last common ancestor of Lepidoptera), SlitOR5 belonged to a lineage distantly related to the type I PR clade, as well as to the lineages containing type 0 and type II PRs (**Figure 1B**). These four paralogous lineages grouped within a larger clade highly supported by the bootstrap analysis (highlighted in grey in **Figure 1B**). This clade has been previously shown to contain ORs tuned to terpenes and aliphatic molecules – including sex pheromones – and exhibits higher evolutionary rates compared to more ancient clades that contain many receptors for aromatics (**de Fouchier et al., 2017**).

SlitOR5 binds (*Z,E*)-9,11-14:OAc with high specificity and sensitivity

We next used two complementary heterologous systems to characterize the function of SlitOR5 and assess whether it is the receptor to (*Z,E*)-9,11-14:OAc, the major component of the *S. littoralis* sex pheromone blend. First, we expressed SlitOR5 in *Drosophila melanogaster* OSNs housed in at1 trichoid sensilla, in place of the endogenous PR DmelOR67d (**Kurtovic et al., 2007**). Single-sensillum recordings were performed to measure the response of at1 OSNs to 26 type I pheromone compounds (**Supplementary file 1**), including all the components identified in the pheromones of *Spodoptera* species (**El-Sayed, 2018**). SlitOR5-expressing OSNs strongly responded to (*Z,E*)-9,11-14:OAc (65 ± 15 spikes.s^{-1}), whereas there was no significant response to any other compound (**Figure 2A**).

Then, we co-expressed SlitOR5 with its co-receptor SlitOrco in *Xenopus* oocytes and recorded the responses to the same panel of pheromone compounds using two-electrode voltage-clamp. A strong current was induced in SlitOR5-expressing oocytes when stimulated with (*Z,E*)-9,11-14:OAc (3.9 ± 0.3 µA), whereas only minor currents were recorded in response to (*Z,E*)-9,12-14:OAc and (*Z*)-9-12:OAc (**Figure 2B**). SlitOR5 sensitivity was assessed with a dose-response experiment that showed a low detection threshold (10^{-8} M) and an EC_{50} of 1.707×10^{-7} M (**Figure 2D–E**).

We compared the response spectra of heterologously expressed SlitOR5 with that of *S. littoralis* male OSNs housed in type one long trichoid sensilla (LT1A OSNs, **Figure 2C**), known to detect (*Z,E*)-9,11-14:OAc (**Ljungberg et al., 1993**; **Quero et al., 1996**). When stimulated with the 26 pheromone compounds, LT1A OSNs significantly responded to (*Z,E*)-9,11-14:OAc (55 ± 4 spikes.s^{-1}) and to a lesser extent to its stereoisomer (*Z,Z*)-9,11-14:OAc, which is absent from any *Spodoptera* pheromone. This mirrored the response spectra of heterologously expressed SlitOR5, especially the one observed in *Drosophila* OSNs (**Figure 2A**).

In vivo response to (*Z,E*)-9,11-14:OAc is abolished in *SlitOr5* mutant males

To confirm in vivo that SlitOR5 is the receptor for the major sex pheromone component of *S. littoralis*, we carried out a loss-of-function study by generating mutant insects for the gene *SlitOr5*. The CRISPR/Cas9 genome editing system was used to create a mutation in the first exon of *SlitOr5* with the aim of disrupting the open-reading frame. Guide RNAs were injected along with the Cas9 protein in more than one thousand eggs. We genotyped 66 G0 hatched larvae and found seven individuals carrying at least one mutation in *SlitOr5*. These 7 G0 individuals were back-crossed with wild-type individuals to create 7 G1 heterozygous mutant lines. We selected a line carrying a single mutation that consisted of a 10 bp deletion at the expected location, introducing a premature STOP codon within the *SlitOr5* transcript after 247 codons (**Figure 3A**).

We next generated G2 homozygous mutant males (*SlitOr5*$^{-/-}$) and compared their ability to detect (*Z,E*)-9,11-14:OAc to that of wild-type and heterozygous (*SlitOr5*$^{+/-}$) males, using electroantennogram (EAG) recordings (**Figure 3B**). When stimulated with (*Z,E*)-9,11-14:OAc, wild-type and *SlitOr5*$^{+/-}$ antennae exhibited similar EAG amplitudes (0.89 mV and 1.16 mV, respectively), whereas the response was completely abolished in *SlitOr5*$^{-/-}$ antennae (0.02 mV). Control experiments using a *S. littoralis* minor pheromone component and plant volatiles known to induce EAG responses in *S. littoralis* (**Saveer et al., 2012**; **López et al., 2017**) showed that antennal responses were not

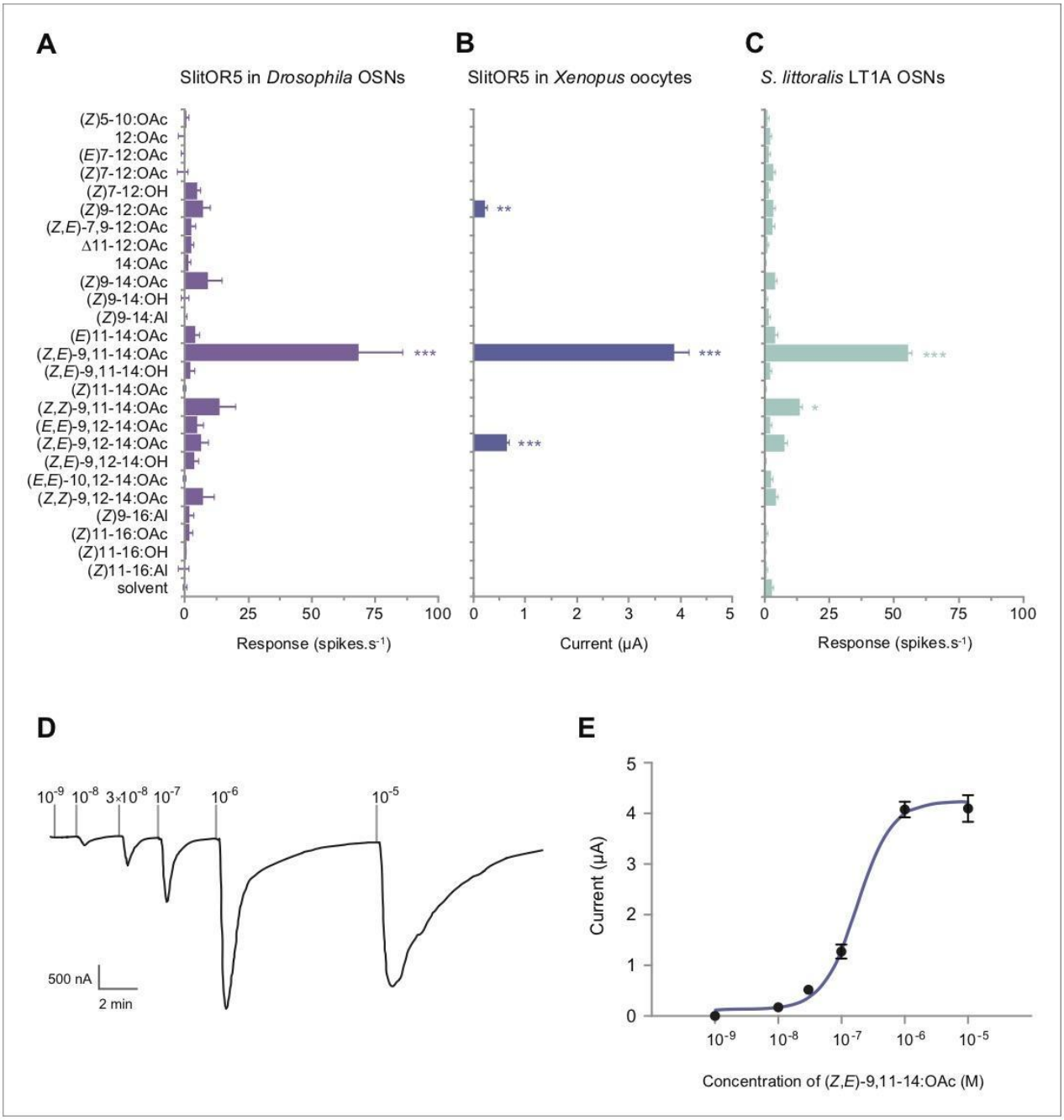


Figure 2. SlitOR5 is the receptor for the major component of the *S. littoralis* pheromone blend. (**A**) Action potential frequency of *Drosophila* at1 OSNs expressing SlitOR5 (n = 8) after stimulation with 26 type I pheromone compounds (10 µg loaded in the stimulus cartridge). ***p<0.001, significantly different from the response to solvent (one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test). (**B**) Inward current measured in *Xenopus* oocytes co-expressing SlitOR5 and SlitOrco (n = 13–16) after stimulation with the same panel of pheromone compounds (10^{-4} M solution). ***p<0.001, **p<0.01, significantly different from 0 (Wilcoxon signed rank test). (**C**) Action potential frequency of LT1A OSNs from *S. littoralis* male antennae (n = 8–16) after stimulation with pheromone compounds (1 µg loaded in the stimulus cartridge). ***p<0.001, *p<0.1, significantly different from the response to solvent (one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test). (**D**) Representative trace showing the response of a *Xenopus* oocyte co-expressing SlitOR5 and SlitOrco after stimulation with a range of (*Z,E*)-9,11-14:OAc doses from 10^{-9} M to 10^{-5} M. (**E**) Dose-response curve of SlitOR5/Orco *Xenopus* oocytes

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

(n = 9) stimulated with (*Z*,*E*)-9,11-14:OAc (EC_{50} = 1.707 × 10^{-7} M). Plotted values in (**A–C and E**) are mean responses ± SEM. Raw results for all experiments are available in ***Figure 2—source data 1***.

The online version of this article includes the following source data for figure 2:

Source data 1. Raw results of electrophysiology experiments.

impaired in *SlitOr5*$^{-/-}$ mutants, as these odorants elicited similar responses in wild-type, heterozygous and homozygous moths (***Figure 3B***).

Then, we analyzed the courtship behavior of *SlitOr5*$^{-/-}$ and wild-type males in the presence of (*Z*,*E*)-9,11-14:OAc, and found a strong behavioral defect in mutants. Whereas more than 80% of wild-type males initiated a movement toward the pheromone source in the first 8 min, only a minority of *SlitOr5* mutants initiated such a movement (even after 30 min of test), a response similar to that of control wild-type males not stimulated with the pheromone (***Figure 3C***). All the steps of the courtship behavior were similarly affected (***Figure 3—figure supplement 1***). We also verified whether *SlitOr5* knock-out would result in mating inability. When paired with a wild-type virgin female, only 1 out of the 13 *SlitOr5*$^{-/-}$ males tested was able to mate, compared to ~75% for wild-type males (***Figure 3D***). This behavioral defect was further confirmed by analyzing the number of eggs laid by the females and the number of offspring (***Figure 3E***). Overall, these results confirm that SlitOR5 is the receptor responsible for the detection of the major component of the *S. littoralis* female pheromone blend.

A novel lineage of candidate moth pheromone receptors

In view of these results and the unexpected phylogenetic position of SlitOR5, we rebuilt the phylogeny of the lepidopteran OR clade containing SlitOR5 and the known receptors for type 0, type I and type II pheromones (highlighted in grey in ***Figure 1B***), adding all ORs showing a strong sex-biased expression (at least 10-fold in one sex compared to the other) and ORs whose ligands were known as of September 2018 (***Supplementary file 2***). ORs grouped within eight different paralogous lineages, four of which including PRs (***Figure 4***). One was the so-called PR clade that, as previously observed, contained all type I PRs characterized so far (except SlitOR5) as well as two type II PRs (***Zhang et al., 2016***). The other three lineages harboring PRs consisted of one containing SlitOR5, one containing EgriOR31 (a type II PR from the geometrid *Ectropis grisescens*; ***Li et al., 2017***) and one containing EsemOR3 and 5 (type 0 PRs from the non-dytrisian moth *Eriocrania semipurpurella*; ***Yuvaraj et al., 2017***). Interestingly, most sex-biased lepidopteran ORs identified to date clustered within the PR clade and the lineage containing SlitOR5. While sex-biased ORs within the PR clade were mainly male-biased, the SlitOR5 lineage contained an equal proportion of male and female-biased receptors, identified from species belonging to different families of Lepidoptera. Deep nodes within the phylogeny were highly supported by the bootstrap analysis, enabling us to state that these two PR-containing clades were more closely related to clades harboring receptors for plant volatiles than to each other. This suggests that receptors tuned to type I pheromone compounds emerged twice independently during the evolution of Lepidoptera, and that the clade containing SlitOR5 may constitute a novel lineage of candidate PRs.

Discussion

While moth sex pheromone receptors have been the most investigated ORs in Lepidoptera, with more than 60 being functionally characterized (***Zhang and Löfstedt, 2015***), it remains unclear how and when these specialized receptors arose. Type I PRs have been proposed to form a monophyletic, specialized clade of ORs, the so-called 'PR clade', which emerged early in the evolution of Lepidoptera (***Yuvaraj et al., 2017***; ***Yuvaraj et al., 2018***). Here, we bring functional and phylogenetic evidence that type I PRs are not restricted to this clade and likely appeared twice independently in Lepidoptera. We focused on an atypical OR, SlitOR5, which exhibited a strong male-biased expression in antennae of the noctuid moth *S. littoralis* but did not group with the PR clade. We demonstrated, using a combination of heterologous expression and loss-of-function studies, that this OR is responsible for the detection of (*Z*,*E*)-9,11-14:OAc, the major component of the *S. littoralis* sex pheromone blend. Due to the unexpected phylogenetic position of SlitOR5 outside of the previously

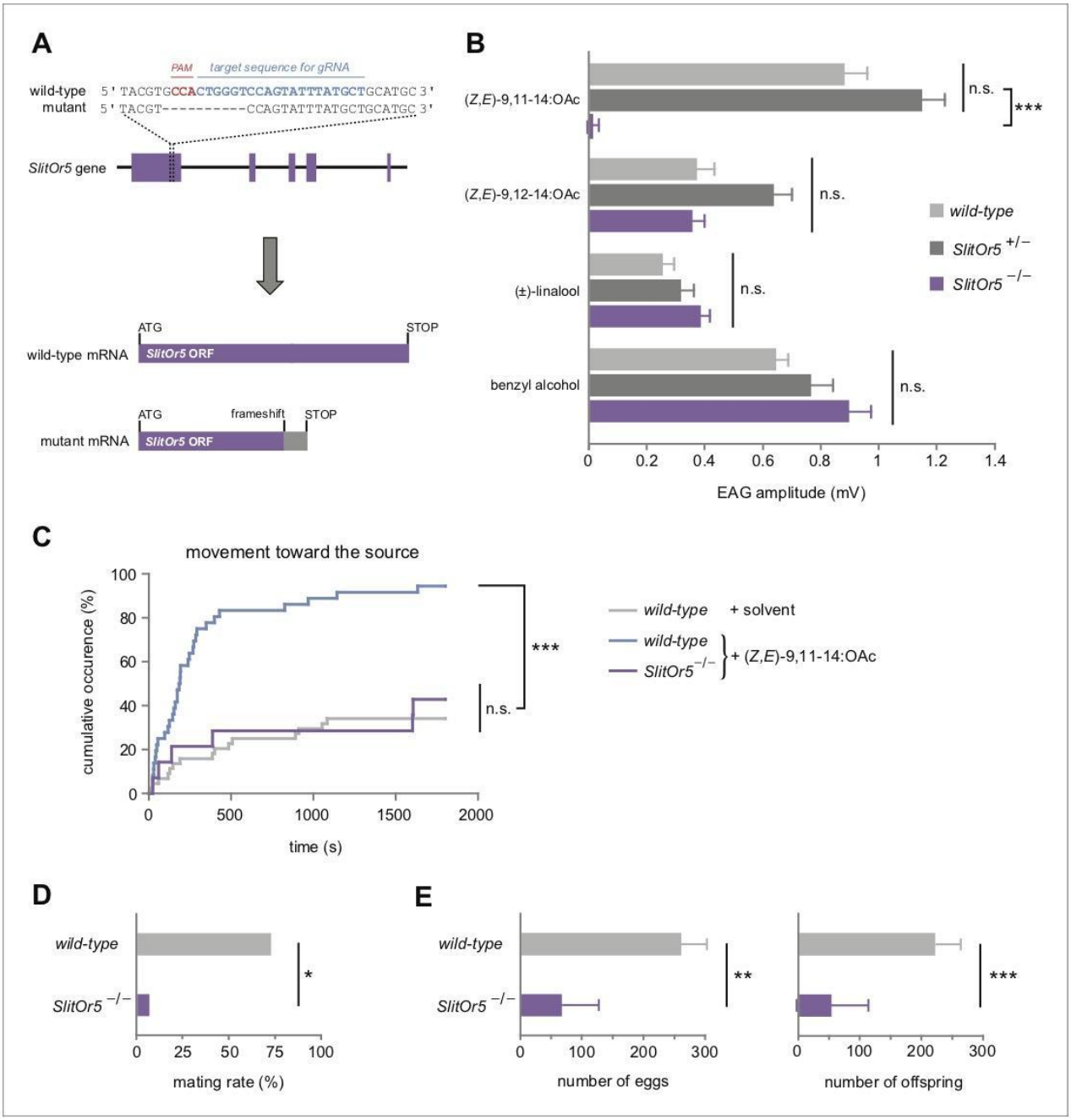


Figure 3. Response to the major pheromone component is abolished in *SlitOr5* mutants. (**A**) Location of the 10 bp deletion induced in the first exon of the *SlitOr5* gene by the CRISPR/Cas9 system. The sequence complementary to the RNA guide is indicated in blue, and the protospacer adjacent motif (PAM) in red. The frameshift created in the *SlitOr5* open-reading frame (ORF) induced a premature stop codon. (**B**) Electroantennogram (EAG) amplitude measured in *S. littoralis* male antennae isolated from wild-type animals (light grey, $n = 14$), heterozygous *SlitOr5* mutants (dark grey, $n = 18$) and homozygous *SlitOr5* mutants (purple, $n = 8$) after stimulation with pheromone compounds (1 µg in the stimulus cartridge) and plant volatiles (10 µg in the stimulus cartridge). Plotted values represent the normalized mean response ± SEM (response to the solvent was subtracted). ***p<0.001, significantly different from the response of the other genotypes; n.s.: not significantly different (one-way ANOVA, followed by a Tukey's post hoc test). Raw results for the EAG experiment are available in ***Figure 3—source data 1***. (**C**) Cumulative proportion of *S. littoralis* males initiating a movement toward the odor source in homozygous *SlitOr5* mutants (purple, $n = 14$) stimulated with the major pheromone component (100 ng in the stimulus

Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

cartridge) and in wild-type animals stimulated with the pheromone (blue, $n = 36$) or with solvent alone (light grey, $n = 44$). ***p<0.001, significantly different from the other distributions; n.s.: not significantly different (log-rank test). Results obtained for other behavioral items are presented in ***Figure 3—figure supplement 1***. (**D**) Proportion of wild-type *S. littoralis* males (light grey, $n = 49$) and homozygous *SlitOr5* mutants (purple, $n = 13$) that mated with a wild-type female during a period of 6 hr in the scotophase. *p<0.05, significant difference between the two genotypes (Fisher's exact test). (**E**) Number of eggs laid (left panel) and of offspring (right panel) obtained per female after the mating experiment. Plotted values represent the mean ± SEM. ***p<0.001, **p<0.005, significant difference between the two genotypes (Mann-Whitney *U* test). Raw results for all the behavioral experiments are available in ***Figure 3—source data 2***.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 3:

Source data 1. Raw results of the EAG experiment.
Source data 2. Raw results of behavioral experiments.
Figure supplement 1. Behavioral response of wild-type and homozygous *SlitOr5* mutants to the major pheromone component.

defined PR clade, the question arose whether SlitOR5 is an exception or belongs to a previously unknown clade of moth PRs. This latter hypothesis is supported by the observation that the paralogous lineage containing SlitOR5 harbored many other sex-biased ORs, identified in species from six distinct lepidopteran families. Notably, male-biased ORs have been found in Lasiocampidae, Sphingidae, Noctuidae and Tortricidae. Among these, two ORs from *Ctenopseustis obliquana* and *C. herana* (Tortricidae) have been functionally studied by heterologous expression in cell cultures, but no ligand could be identified (***Steinwender et al., 2015***). In the Lasiocampidae species *Dendrolimus punctatus*, these male-biased ORs have been referred to as 'Dendrolimus-specific odorant receptors', with the suspicion that they would represent good PR candidates since in *Dendrolimus* species, there is no OR clustering in the PR clade (***Zhang et al., 2014***; ***Zhang et al., 2017***). No functional data yet confirmed this suspicion.

Conversely, within the SlitOR5 lineage, almost half of the sex-biased ORs were female-biased (13 out of 28, compared to 4 out of 63 in the classical PR clade). Female-biased ORs have been generally proposed to be involved in the detection of plant-emitted oviposition cues, as demonstrated in *Bombyx mori* (***Anderson et al., 2009***). However, another interesting hypothesis is that they could be tuned to male sex pheromones. In moths, little attention has been put on male pheromones, which are known to be involved in various mating behaviors such as female attraction, female acceptance, aggregation of males to form leks, mate assessment or inhibition of other males (reviewed in ***Conner and Iyengar, 2016***). The use of male pheromone systems has been selected multiple times in distinct moth families, as reflected by the chemical diversity of male pheromone compounds and of the disseminating structures (***Birch et al., 1990***; ***Phelan, 1997***; ***Conner and Iyengar, 2016***). It is thus expected that this polyphyletic nature of male pheromones would result in a large diversity of female PR types. Accordingly, female-biased ORs were found in different clades within the phylogeny. However, most remain orphan ORs, including BmorOR30 that does belong to the SlitOR5 lineage but for which no ligand could be identified (***Anderson et al., 2009***). Although the most common male-emitted volatiles are plant-derived pheromones (***Conner and Iyengar, 2016***), some male courtship pheromones are long-chained hydrocarbons related to type I female pheromone compounds (***Hillier and Vickers, 2004***) that could be detected by female-biased type I PRs such as those identified within the SlitOR5 lineage.

The ancestral protein from which the so-called 'PR clade' would have arisen is thought to be an OR tuned to plant-emitted volatiles (***Yuvaraj et al., 2017***; ***Yuvaraj et al., 2018***). Here, we evidence that SlitOR5 is a new type I PR that belongs to a distinct early diverging lineage for which a role in pheromone detection had never been demonstrated. Together with the findings that PRs for Type 0 (***Yuvaraj et al., 2017***) and one PR for type II pheromones (***Li et al., 2017***) group in distinct paralogous lineages also unrelated to the PR clade, our data suggest that lepidopteran PRs have evolved four times in four paralogous lineages. Whether the SlitOR5 lineage has evolved from ORs that detected structurally related plant volatiles - as has been proposed for type 0 (***Yuvaraj et al., 2017***) and classical type I PRs - remains elusive. Yet, no OR tuned to plant volatiles has been identified in closely related lineages. More functional data on SlitOR5 paralogs and orthologs in different moth species, possibly revealing more type I PRs, will help in understanding evolutionary history of this lineage, as to when and how these receptors have evolved, and confirm that we are facing a novel type I PR clade.

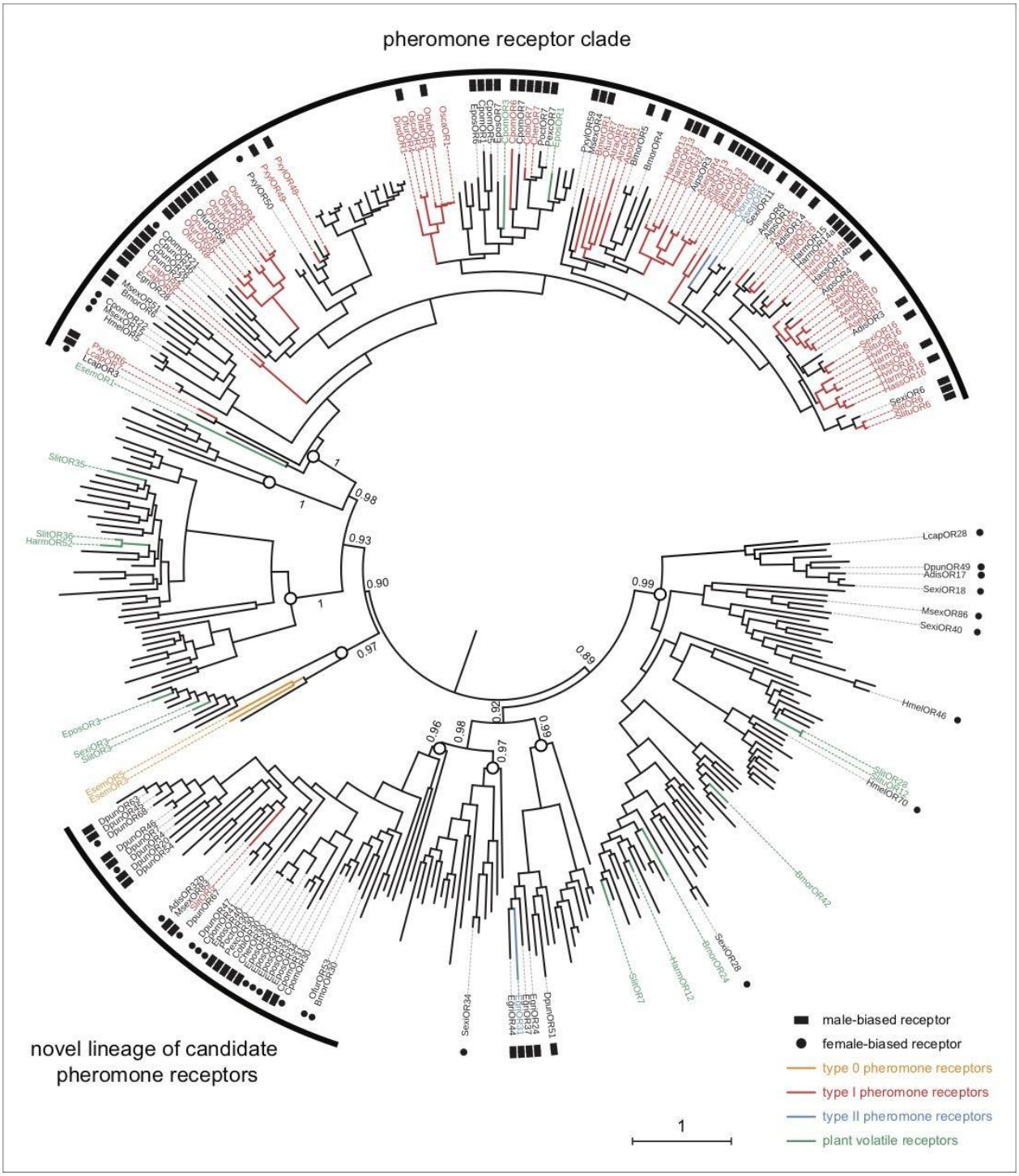


Figure 4. SlitOR5 may define a novel lineage of candidate pheromone receptors in Lepidoptera. Maximum likelihood phylogeny of the lepidopteran OR clade that includes all the paralogous lineages containing pheromone receptors. 360 sequences from 34 lepidopteran species were included. Functional and expression data shown on the figure have been compiled from the literature (***Supplementary file 2***). Branch colors indicate OR function, when characterized: PRs for type I pheromones are depicted in red, those for type II pheromones in blue and those for type 0 pheromones in

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

orange. ORs tuned to plant volatiles are depicted in green. Symbols at the edge indicate expression data: male-biased ORs are highlighted with black squares and female-biased ORs with black dots. Circles on the nodes indicate the distinct paralogous OR lineages. Support values on basal nodes are transfer bootstrap expectation (TBE) values. The tree has been rooted using an outgroup as identified in the lepidopteran OR phylogeny shown in ***Figure 1***. The scale bar indicates the expected number of amino acid substitutions per site. The sequence alignment file is available in ***Figure 4—source data 1***.

The online version of this article includes the following source data for figure 4:

Source data 1. Alignment of amino acid sequences used to build the phylogeny (FASTA format).

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Gene (*Spodoptera littoralis*)	*SlitOr5*	GenBank	GB:MK614705	
Gene (*Spodoptera littoralis*)	*SlitOrco*	***Malpel et al. (2008)***; PMID:18828844; GenBank	GB:EF395366	
Genetic reagent (*Drosophila melanogaster*)	*Or67d*^{GAL4}	***Kurtovic et al. (2007)***; PMID: 17392786	FLYB:FBal0210948	kindly provided by B. Dickson
Genetic reagent (*Drosophila melanogaster*)	*y*^{1} *M{vas-int.Dm}ZH-2A w*; M{3xP3-RFP.attP}ZH-51C*	***Bischof et al. (2007)***; PMID: 17360644; Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:24482	
Genetic reagent (*Drosophila melanogaster*)	*UAS-SlitOr5*	This study		See Materials and methods
Recombinant DNA reagent	pUAST.attB (plasmid)	***Bischof et al. (2007)***; PMID: 17360644; GenBank	GB:EF362409	kindly provided by J. Bischof
Recombinant DNA reagent	pUAST.attB-*SlitOr5* (plasmid)	This study		See Materials and methods
Recombinant DNA reagent	pCS2+ (plasmid)	***Turner and Weintraub (1994)***; PMID: 7926743		kindly provided by C. Héligon
Recombinant DNA reagent	pCS2+-*SlitOr5* (plasmid)	This study		See Materials and methods
Recombinant DNA reagent	pCS2+-*SlitOrco* (plasmid)	This study		See Materials and methods
Sequence-based reagent	*Or5up*	This study	PCR primers	TCGGGAGAAACTGAAGGACGTTGT
Sequence-based reagent	*Or5do*	This study	PCR primers	GCACGGAACCGCACTTATCACTAT
Sequence-based reagent	*Rpl13up*	This study	PCR primers	GTACCTGCCGCTCTCCGTGT
Sequence-based reagent	*Rpl13do*	This study	PCR primers	CTGCGGTGAATGGTGCTGTC
Sequence-based reagent	*SlitOr5* guide RNA	This study	gRNA	AGCATAAATACTGGACCCAGTGG
Sequence-based reagent	*Or5*_forward	This study	PCR primers	CCAAAAGGACTTGGACTTTGAA
Sequence-based reagent	*Or5*_reverse	This study	PCR primers	CCCGAATCTTTTCAGGATTAGAA

Animal rearing and chemicals

S. littoralis were reared in the laboratory on a semi-artificial diet (**Poitout and Buès, 1974**) at 22˚C, 60% relative humidity and under a 16 hr light:8 hr dark cycle. Males and females were sexed as pupae and further reared separately. *D. melanogaster* lines were reared on standard cornmeal-yeast-agar medium and kept in a climate- and light-controlled environment (25˚C, 12 hr light:12 hr dark cycle). The 26 pheromone compounds used for electrophysiology experiments (**Supplementary file 1**) were either synthesized in the lab or purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and Pherobank (Wijk bij Duurstede, The Netherlands). Paraffin oil was purchased from Sigma-Aldrich and hexane from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France).

Quantitative real-time PCR

Total RNA from three biological replicates of 15 pairs of antennae of two-day-old virgin male and female *S. littoralis* was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), which included a DNase treatment. cDNA was synthesized from total RNA (1 µg) using Invitrogen SuperScript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Gene-specific primers were designed for *SlitOr5* (*Or5up*: 5'-TCGGGAGAAACTGAAGGACGTTGT-3', *Or5do*: 5'-GCACGGAACCGCAC TTATCACTAT-3') and for the reference gene *SlitRpl13* (*Rpl13up*: 5'-GTACCTGCCGCTCTCCGTGT-3', *Rpl13do*: 5'-CTGCGGTGAATGGTGCTGTC-3'). qPCR mix was prepared in a total volume of 10 µL with 5 µL of LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland), 4 µL of diluted cDNA (or water for the negative control) and 0.5 µM of each primer. qPCR assays were performed using the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche). All reactions were performed in triplicate for the three biological replicates. The PCR program began with a cycle at 95˚C for 13.5 min, followed by 50 cycles of 10 s at 95˚C, 15 s at 60˚C and 15 s at 72˚C. Dissociation curves of the amplified products were performed by gradual heating from 55˚C to 95˚C at 0.5 ˚C.s^{-1}. A negative control (mix without cDNA) and a fivefold dilution series protocol of pooled cDNAs (from all conditions) were included. The fivefold dilution series were used to construct relative standard curves to determine the PCR efficiencies used for further quantification analyses. Data were analyzed with the LightCycler 480 software (Roche). Normalized expression of the *SlitOr5* gene was calculated with the Q-Gene software (**Joehanes and Nelson, 2008**) using *SlitRpl13* as a reference, considering it displays consistent expression as previously described in **Durand et al. (2010)**.

Heterologous expression of SlitOR5 in *Drosophila*

The *SlitOr5* full-length open-reading frame (1191 bp, GenBank acc. num. MK614705) was subcloned into the pUAST.attB vector. Transformant *UAS-SlitOr5* balanced fly lines were generated by BestGene Inc (Chino Hills, CA), by injecting the pUAST.attB-*SlitOr5* plasmid (Endofree prepared, Qiagen) into fly embryos with the genotype y^1 *M{vas-int.Dm}ZH-2A w*; M{3xP3-RFP.attP}ZH-51C* (**Bischof et al., 2007**), leading to a non-random insertion of the *UAS-SlitOr5* construct into the locus 51C of the second chromosome. The *UAS-SlitOr5* balanced line was then crossed to the $Or67d^{GAL4}$ line (**Kurtovic et al., 2007**) to obtain double homozygous flies (genotype *w; UAS-SlitOr5,*w^+*;* $Or67d\text{-}^{GAL4}$) expressing the *SlitOr5* transgene in at1 OSNs instead of the endogenous *Drosophila* receptor gene *Or67d*. The correct expression of *SlitOr5* was confirmed by RT-PCR on total RNA extracted from 100 pairs of antennae.

Single-sensillum recordings

Single-sensillum extracellular recordings on *Drosophila* at1 OSNs were performed as previously described (**de Fouchier et al., 2015**). OSNs were stimulated during 500 ms, using stimulus cartridges containing 10 µg of pheromone (1 µg/µl in hexane) dropped onto a filter paper. Single-sensillum recordings on *S. littoralis* LT1A OSNs were performed using the tip-recording technique, as previously described (**Pézier et al., 2007**). Briefly, the tips of a few LT1 sensilla were cut off using sharpened forceps and a recording glass electrode filled with a saline solution (170 mM KCl, 25 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 6 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES and 7.5 mM glucose, pH 6.5) was slipped over the end of a cut LT1 sensillum. OSNs were stimulated with an air pulse of 200 ms (10 L.h^{-1}), odorized using a stimulus cartridge containing 1 µg of pheromone (diluted at 1 µg/µl in hexane). Odorants were considered as active if the response they elicited was statistically different from the response elicited by the solvent alone (one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test).

Heterologous expression of SlitOR5 in *Xenopus* oocytes and two-electrode voltage-clamp recordings

Open-reading frames of *SlitOr5* and *SlitOrco* (GenBank acc. num. EF395366, **Malpel et al., 2008**) were subcloned into the pCS2+ vector (**Turner and Weintraub, 1994**). Template plasmids were fully linearized with PteI for pCS2+-*SlitOr5* and NotI for pCS2+-*SlitOrco* and capped cRNAs were transcribed using SP6 RNA polymerase. Purified cRNAs were re-suspended in nuclease-free water at a concentration of 2 µg/µL and stored at −80˚C. Mature healthy oocytes were treated with 2 mg/ml collagenase type I in washing buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ and 5 mM HEPES, pH 7.6) for 1–2 hr at room temperature. Oocytes were later microinjected with 27.6 ng of *SlitOr5* cRNA and 27.6 ng of *SlitOrco* cRNA. After 4 days of incubation at 18˚C in 1 × Ringer's solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 5 mM MgCl2, 0.8 mM CaCl2, and 5 mM HEPES, pH 7.6) supplemented with 5% dialyzed horse serum, 50 mg/ml tetracycline, 100 mg/ml streptomycin and 550 mg/ml sodium pyruvate, the whole-cell currents were recorded from the injected oocytes with a two-electrode voltage clamp. Oocytes were exposed to the 26 pheromone compounds diluted at 10^{-4} M in Ringer's solution, with an interval between exposures which allowed the current to return to baseline. Data acquisition and analysis were carried out with Digidata 1440A and pCLAMP10 software (Molecular Devices, San Jose, CA). Odorants were considered as active if the mean response they elicited was statistically different from 0 (Wilcoxon signed rank test). Dose–response experiments were performed using pheromone concentrations ranging from 10^{-9} up to 10^{-5} M and data were analyzed using GraphPad Prism 5.

SlitOr5 knock-out via CRISPR/Cas9

A guide RNA (gRNA sequence: AGCATAAATACTGGACCCAG TGG) was designed against the first exon of the *SlitOr5* gene using the CRISPOR gRNA design tool (crispor.tefor.net; **Haeussler et al., 2016**) and transcribed after subcloning into the DR274 vector using the HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA). The Cas9 protein was produced in *Escherichia coli* as previously described (**Ménoret et al., 2015**). A mix of Cas9 protein and gRNA was injected in freshly laid eggs using an Eppendorf - Transjector 5246, as previously described (**Koutroumpa et al., 2016**). Individual genotyping at every generation was performed via PCR on genomic DNA extracted from larvae pseudopods (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, WI) using gene-specific primers (*Or5*_forward: 5'-CCAAAAGGACTTGGACTTTGAA-3'; *Or5*_reverse: 5'-CCCGAATCTTTTCAGGATTAGAA-3') amplifying a fragment of 728 bp encompassing the target sequence. Mutagenic events were detected by sequencing the amplification products (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). G0 larvae carrying a single mutagenic event were reared until adults and crossed with wild-type individuals. Homozygous G2 individuals were obtained by crossing G1 heterozygous males and females.

Phenotyping of CRISPR/Cas9 mutants by electroantennogram recordings

Electroantennogram recordings were performed as previously described (**Koutroumpa et al., 2016**) on isolated male antennae from wild-type animals and from heterozygous and homozygous *SlitOr5* mutants. Antennae were stimulated using stimulus cartridges loaded with 10 µg of linalool or benzyl alcohol diluted in paraffin oil, and 1 µg of (*Z*,*E*)-9,11-14:OAc or (*Z*,*E*)-9,12-14:OAc diluted in hexane. Stimulations lasted for 500 ms (30 L/h). Negative controls consisted of paraffin oil and hexane alone. The maximum depolarization amplitude was measured using the pCLAMP10 software. Normalized mean responses were calculated (response to the solvent was subtracted) and data were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test.

Behavioral experiments

For courtship monitoring, 2-day-old wild-type or homozygous *SlitOr5* mutant males were placed individually in a plastic squared petri dish (size = 12 cm) before the onset of the scotophase, and experiments started at the middle of the scotophase (22˚C, 70% relative humidity). Odorant stimulation was performed using Pasteur pipettes containing a filter paper loaded with 100 ng of (*Z*,*E*)-9,11-14:OAc (10 ng/µl in hexane), or hexane alone as control. The narrow end of the pipette was inserted into the petri dish, and a constant stream of charcoal-filtered, humidified air (0.2 $L.min^{-1}$) passed

through the pipette during all the experiment. Male courtship behavior was recorded under dim red light during 30 min using a webcam (Logitech QuickCam Pro 9000). The latency of each of the following stereotyped behavioral items was individually screened: antennal flicking, movement toward the odor source, wing fanning, abdomen curving and extrusion of genitalia. Results were presented as cumulative occurrence of each item along the time of the experiment. Statistical analysis of the distributions obtained for each treatment were compared using a log-rank (Mantel-Cox) test. For mating experiments, 2-day-old wild-type or homozygous *SlitOr5* mutant males were paired with a 2-day-old wild-type virgin female in a cylindrical plastic box (diameter 8 cm, height 5 cm), the walls of which were covered up with filter paper. Experiments started at the onset of the scotophase and lasted over 6 hr. Copulation events were visually inspected every 20 min under dim red light. After the end of the experiment, females were kept in the boxes for 12 hr. Then, females were discarded and filter papers were examined for the presence of egg clutches. When present, eggs were transferred to a rearing plastic box, hatch was monitored every day during 7 days and second-instar larvae were counted, if any. Statistical analysis of mating rates was done using a Fisher's exact test, and analyses of the number of eggs and offspring were done using a Mann-Whitney *U* test.

Phylogenetic analyses

The dataset of lepidopteran amino acid OR sequences used to build the phylogeny shown in ***Figure 1*** included entire OR repertoires from the following nine species, each belonging to a different lepidopteran superfamily: *Bombyx mori* (Bombycoidea; ***Tanaka et al., 2009***), *Dendrolimus punctatus* (Lasiocampoidea; ***Zhang et al., 2017***), *Ectropis grisescens* (Geometroidea; ***Li et al., 2017***), *Epiphyas postvittana* (Tortricoidea; ***Corcoran et al., 2015***), *Eriocrania semipurpurella* (Eriocranioidea; ***Yuvaraj et al., 2017***), *Heliconius melpomene* (Papilionoidea; ***Heliconius Genome Consortium, 2012***), *Ostrinia furnacalis* (Pyraloidea; ***Yang et al., 2015***), *Plutella xylostella* (Yponomeutoidea; ***Engsontia et al., 2014***) and *Spodoptera littoralis* (Noctuoidea; ***Walker et al., 2019***). The dataset used to build the phylogeny shown in ***Figure 4*** contained amino acid sequences from the same nine species falling into that clade, plus all the sequences of ORs within that clade showing a marked sex-biased expression (threshold of a 10-fold difference in expression rate between male and female antennae, based on RNAseq or qPCR experiments) and/or for which ligands have been identified as of September 2018 (***Supplementary file 2***). Alignments were performed using Muscle (***Edgar, 2004***) as implemented in Jalview v2.10.5 (***Waterhouse et al., 2009***). Phylogenetic reconstruction was performed using maximum likelihood. The best-fit model of protein evolution was selected by SMS (***Lefort et al., 2017***) and tree reconstruction was performed using PhyML 3.0 (***Guindon et al., 2010***). Node support was first assessed using 100 bootstrap iterations, then the file containing bootstrap trees was uploaded on the Booster website (***Lemoine et al., 2018***) to obtain the TBE (Transfer Bootstrap Expectation) node support estimation. Figures were created using the iTOL web server (***Letunic and Bork, 2016***).

Acknowledgements

We are grateful to Lixiao Du and Françoise Bozzolan for technical assistance, Bin Yang for his help and advice, and Pascal Roskam and Philippe Touton for insect rearing. We also thank Christophe Héligon (CRB Xénope, Rennes) for providing the pCS2+ plasmid. This work has been funded by the French National Research Agency (ANR-16-CE02-0003-01 and ANR-16-CE21-0002-01 grants), the National Natural Science Foundation of China (31725023, 31621064) and a PRC NSFC-CNRS 2019 grant. Research was conducted as part of the CAAS-INRA Associated International Laboratory in Plant Protection.

Additional information

Competing interests

Arthur de Fouchier, Emmanuelle Jacquin-Joly, Nicolas Montagné: The intellectual property rights of SlitOR5 have been licensed by Inra, Sorbonne Université and CNRS for the purpose of developing novel insect control agents. The other authors declare that no competing interests exist.

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	ANR-16-CE02-0003-01	Nicolas Montagné
Agence Nationale de la Recherche	ANR-16-CE21-0002-01	Emmanuelle Jacquin-Joly
National Natural Science Foundation of China	31725023	Guirong Wang
National Natural Science Foundation of China	31621064	Guirong Wang
PRC NSFC-CNRS		Guirong Wang

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Lucie Bastin-Héline, Data curation, Investigation, Writing—original draft; Arthur de Fouchier, William B Walker III, Investigation, Writing—review and editing; Song Cao, Data curation, Investigation, Writing—review and editing; Fotini Koutroumpa, Gabriela Caballero-Vidal, Stefania Robakiewicz, Marie-Christine François, Tatiana Ribeyre, Annick Maria, Thomas Chertemps, Investigation; Christelle Monsempes, Data curation, Investigation; Anne de Cian, Resources; Guirong Wang, Conceptualization, Funding acquisition, Writing—review and editing; Emmanuelle Jacquin-Joly, Conceptualization, Funding acquisition, Writing—original draft; Nicolas Montagné, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Writing—original draft

Author ORCIDs

William B Walker III https://orcid.org/0000-0003-2798-9616
Emmanuelle Jacquin-Joly http://orcid.org/0000-0002-6904-2036
Nicolas Montagné https://orcid.org/0000-0001-8810-3853

Decision letter and Author response

Decision letter https://doi.org/10.7554/eLife.49826.sa1
Author response https://doi.org/10.7554/eLife.49826.sa2

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. List of synthetic compounds used for electrophysiology experiments.
- Supplementary file 2. Functional and sex-biased expression data available for lepidopteran pheromone receptors (as of September 2018).
- Transparent reporting form

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files. Source data files have been provided for Figures 1, 2, 3 and 4.

References

Anderson AR, Wanner KW, Trowell SC, Warr CG, Jaquin-Joly E, Zagatti P, Robertson H, Newcomb RD. 2009. Molecular basis of female-specific odorant responses in Bombyx mori. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**:189–197. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.11.002, PMID: 19100833

Ando T, Inomata S, Yamamoto M. 2004. Lepidopteran Sex Pheromones. In: Schulz S (Ed). *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I, Topics in Current Chemistry*. **96** Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

Binyameen M, Anderson P, Ignell R, Seada MA, Hansson BS, Schlyter F. 2012. Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female Spodoptera littoralis moth: differences in sensitivity and temporal characteristics. *Chemical Senses* **37**:613–629. DOI: https://doi.org/10.1093/chemse/bjs043, PMID: 22459164

Birch MC, Poppy GM, Baker TC. 1990. Scents and Eversible Scent Structures of Male Moths. *Annual Review of Entomology* **35**:25–54 . DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.000325
Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K. 2007. An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. *PNAS* **104**:3312–3317. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104, PMID: 17360644
Butenandt A, Beckmann R, Stamm D, Hecker E. 1959. *Uber Den Sexuallockstoff Des Seidenspinners Bombyx Mori Reindarstellung Und Konstitution*. **284** Zeitschrift Für Naturforschung 14b.
Cardé RT, Haynes KF. 2004. Structure of the pheromone communication channel in moths. In: Cardé RT, Millar JG (Eds). *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.
Chertemps T. 2017. Molecular Basis of Pheromone Detection in Insects. In: *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.
Conner WE, Iyengar VK. 2016. Male Pheromones in Moths: Reproductive Isolation, Sexy Sons, and Good Genes. In: Allison J. D, Cardé R. T (Eds). *Pheromone Communication in Moths: Evolution, Behavior and Application*. Oakland: University of California Press.
Corcoran JA, Jordan MD, Thrimawithana AH, Crowhurst RN, Newcomb RD. 2015. The peripheral olfactory repertoire of the lightbrown apple moth, Epiphyas postvittana. *PLOS ONE* **10**:e0128596. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128596, PMID: 26017144
de Fouchier A, Sun X, Monsempes C, Mirabeau O, Jacquin-Joly E, Montagné N. 2015. Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus Spodoptera. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3**:95. DOI: https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00095
de Fouchier A, Walker WB, Montagné N, Steiner C, Binyameen M, Schlyter F, Chertemps T, Maria A, François MC, Monsempes C, Anderson P, Hansson BS, Larsson MC, Jacquin-Joly E. 2017. Functional evolution of lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nature Communications* **8**:15709. DOI: https://doi.org/10.1038/ncomms15709, PMID: 28580965
Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Montagné N, Jacquin-Joly E, Debernard S, Maïbèche-Coisne M. 2010. A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology* **19**:87–97. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00939.x, PMID: 20002215
Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792–1797. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkh340, PMID: 15034147
El-Sayed AM. 2018. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. http://www.pherobase.com/ [Accessed June 30, 2019].
Engsontia P, Sangket U, Chotigeat W, Satasook C. 2014. Molecular evolution of the odorant and gustatory receptor genes in lepidopteran insects: implications for their adaptation and speciation. *Journal of Molecular Evolution* **79**:21–39. DOI: https://doi.org/10.1007/s00239-014-9633-0, PMID: 25038840
Fleischer J, Krieger J. 2018. Insect pheromone receptors - Key elements in sensing intraspecific chemical signals. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**:425. DOI: https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00425, PMID: 30515079
Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**:307–321. DOI: https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010, PMID: 20525638
Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud J-B, Schneider-Maunoury S, Shkumatava A, Teboul L, Kent J, Joly J-S, Concordet J-P. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* **17**:148 . DOI: https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2
Heliconius Genome Consortium. 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* **487**:94–98. DOI: https://doi.org/10.1038/nature11041, PMID: 22722851
Hillier NK, Vickers NJ. 2004. The role of heliothine hairpencil compounds in female Heliothis virescens (Lepidoptera: noctuidae) behavior and mate acceptance. *Chemical Senses* **29**:499–511. DOI: https://doi.org/10.1093/chemse/bjh052, PMID: 15269122
Joehanes R, Nelson JC. 2008. QGene 4.0, an extensible Java QTL-analysis platform. *Bioinformatics* **24**:2788–2789. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn523, PMID: 18940826
Kaissling K-E. 2014. Pheromone Reception in Insects: The Example of Silk Moths. In: Mucignat-Caretta C (Ed). *Neurobiology of Chemical Communication*. **146** Boca Raton: CRC Press.
Koenig C, Hirsh A, Bucks S, Klinner C, Vogel H, Shukla A, Mansfield JH, Morton B, Hansson BS, Grosse-Wilde E. 2015. A reference gene set for chemosensory receptor genes of Manduca sexta. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **66**:51–63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.007, PMID: 26365739
Koutroumpa FA, Monsempes C, François M-C, de Cian A, Royer C, Concordet J-P, Jacquin-Joly E. 2016. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Scientific Reports* **6**:29620 . DOI: https://doi.org/10.1038/srep29620
Krieger J, Grosse-Wilde E, Gohl T, Dewer YM, Raming K, Breer H. 2004. Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (Heliothis virescens). *PNAS* **101**:11845–11850. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0403052101, PMID: 15289611
Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ. 2007. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a Drosophila sex pheromone. *Nature* **446**:542–546. DOI: https://doi.org/10.1038/nature05672, PMID: 17392786
Lefort V, Longueville JE, Gascuel O. 2017. SMS: smart model selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* **34**:2422–2424. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/msx149, PMID: 28472384
Legeai F, Malpel S, Montagné N, Monsempes C, Cousserans F, Merlin C, François MC, Maïbèche-Coisné M, Gavory F, Poulain J, Jacquin-Joly E. 2011. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the

noctuid moth Spodoptera littoralis: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics* **12**:86. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-86, PMID: 21276261

Lemoine F, Domelevo Entfellner JB, Wilkinson E, Correia D, Dávila Felipe M, De Oliveira T, Gascuel O. 2018. Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature* **556**:452–456. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0, PMID: 29670290

Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* **44**:W242–W245. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkw290, PMID: 27095192

Li Z-Q, Luo Z-X, Cai X-M, Bian L, Xin Z-J, Liu Y, Chu B, Chen Z-M. 2017. Chemosensory Gene Families in Ectropis grisescens and Candidates for Detection of Type-II Sex Pheromones. *Frontiers in Physiology* **8**:953 . DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00953

Ljungberg H, Anderson P, Hansson BS. 1993. Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* **39**: 253–260 . DOI: https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90096-A

Löfstedt C, Wahlberg N, Millar JM. 2016. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera, in: . In: Allison JD, Cardé RT (Eds). *Pheromone Communication in Moths: Evolution, Behavior and Application*. Oakland: University of California Press.

López S, Guerrero A, Bleda MJ, Quero C. 2017. Short-term peripheral sensitization by brief exposure to pheromone components in Spodoptera littoralis. *Journal of Comparative Physiology A* **203**:973–982. DOI: https://doi.org/10.1007/s00359-017-1205-5

Malpel S, Merlin C, François MC, Jacquin-Joly E. 2008. Molecular identification and characterization of two new lepidoptera chemoreceptors belonging to the *Drosophila melanogaster* OR83b family. *Insect Molecular Biology* **17**:587–596. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00830.x, PMID: 18828844

Ménoret S, De Cian A, Tesson L, Remy S, Usal C, Boulé JB, Boix C, Fontanière S, Crénéguy A, Nguyen TH, Brusselle L, Thinard R, Gauguier D, Concordet JP, Cherifi Y, Fraichard A, Giovannangeli C, Anegon I. 2015. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Scientific Reports* **5**: 14410. DOI: https://doi.org/10.1038/srep14410, PMID: 26442875

Montagné N, Chertemps T, Brigaud I, François A, François M-C, de Fouchier A, Lucas P, Larsson MC, Jacquin-Joly E. 2012. Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth Spodoptera littoralis by heterologous expression in Drosophila: characterization of a moth sex pheromone receptor. *European Journal of Neuroscience* **36**:2588–2596. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08183.x

Muñoz L, Rosell G, Quero C, Guerrero A. 2008. Biosynthetic pathways of the pheromone of the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis* . *Physiological Entomology* **33**:275–290. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00645.x

Pézier A, Acquistapace A, Renou M, Rospars JP, Lucas P. 2007. Ca2+ stabilizes the membrane potential of moth olfactory receptor neurons at rest and is essential for their fast repolarization. *Chemical Senses* **32**:305–317. DOI: https://doi.org/10.1093/chemse/bjl059, PMID: 17267420

Phelan PL. 1997. Evolution of mate–signaling in moths: phylogenetic considerations and predictions from the asymmetric tracking hypothesis. In: Choe JC, Crespi BJ (Eds). *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press.

Poitout S, Buès R. 1974. Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. *Annales De Zoologie* **6**: 431–441.

Poivet E, Rharrabe K, Monsempes C, Glaser N, Rochat D, Renou M, Marion-Poll F, Jacquin-Joly E. 2012. The use of the sex pheromone as an evolutionary solution to food source selection in caterpillars. *Nature Communications* **3**:1047. DOI: https://doi.org/10.1038/ncomms2050, PMID: 22948829

Quero C, Lucas P, Renou M, Guerrero A. 1996. Behavioral responses ofSpodoptera littoralis males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. *Journal of Chemical Ecology* **22**:1087–1102. DOI: https://doi.org/10.1007/BF02027947, PMID: 24225930

Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T. 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkmoth Bombyx mori. *PNAS* **101**:16653–16658. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0407596101, PMID: 15545611

Saveer AM, Kromann SH, Birgersson G, Bengtsson M, Lindblom T, Balkenius A, Hansson BS, Witzgall P, Becher PG, Ignell R. 2012. Floral to green: mating switches moth olfactory coding and preference. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**:2314–2322. DOI: https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2710

Smadja C, Butlin RK. 2009. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity* **102**:77–97. DOI: https://doi.org/10.1038/hdy.2008.55, PMID: 18685572

Steinwender B, Thrimawithana AH, Crowhurst RN, Newcomb RD. 2015. Pheromone receptor evolution in the cryptic leafroller species, Ctenopseustis obliquana and C. herana. *Journal of Molecular Evolution* **80**:42–56. DOI: https://doi.org/10.1007/s00239-014-9650-z, PMID: 25252791

Stork NE. 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annual Review of Entomology* **63**:31–45. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348, PMID: 28938083

Tanaka K, Uda Y, Ono Y, Nakagawa T, Suwa M, Yamaoka R, Touhara K. 2009. Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile. *Current Biology* **19**:881–890. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.035, PMID: 19427209

Turner DL, Weintraub H. 1994. Expression of achaete-scute homolog 3 in xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes & Development* **8**:1434–1447. DOI: https://doi.org/10.1101/gad.8.12.1434, PMID: 7926743

Walker WB, Roy A, Anderson P, Schlyter F, Hansson BS, Larsson MC. 2019. Transcriptome analysis of gene families involved in chemosensory function in Spodoptera littoralis (Lepidoptera: noctuidae). *BMC Genomics* **20**:428. DOI: https://doi.org/10.1186/s12864-019-5815-x, PMID: 31138111

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview version 2–a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**:1189–1191. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033, PMID: 19151095

Yang B, Ozaki K, Ishikawa Y, Matsuo T. 2015. Identification of candidate odorant receptors in asian corn borer Ostrinia furnacalis. *PLOS ONE* **10**:e0121261. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121261, PMID: 25803580

Yuvaraj JK, Corcoran JA, Andersson MN, Newcomb RD, Anderbrant O, Löfstedt C. 2017. Characterization of odorant receptors from a Non-ditrysian moth, Eriocrania semipurpurella sheds light on the origin of sex pheromone receptors in lepidoptera. *Molecular Biology and Evolution* **34**:2733–2746. DOI: https://doi.org/10.1093/molbev/msx215, PMID: 29126322

Yuvaraj JK, Andersson MN, Corcoran JA, Anderbrant O, Löfstedt C. 2018. Functional characterization of odorant receptors from Lampronia capitella suggests a non-ditrysian origin of the lepidopteran pheromone receptor clade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **100**:39–47. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.06.002, PMID: 29894821

Zhang S, Zhang Z, Wang H, Kong X. 2014. Antennal transcriptome analysis and comparison of olfactory genes in two sympatric defoliators, Dendrolimus houi and Dendrolimus kikuchii (Lepidoptera: lasiocampidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **52**:69–81. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.06.006, PMID: 24998398

Zhang DD, Wang HL, Schultze A, Froß H, Francke W, Krieger J, Löfstedt C. 2016. Receptor for detection of a type II sex pheromone in the winter moth Operophtera brumata. *Scientific Reports* **6**:18576. DOI: https://doi.org/10.1038/srep18576, PMID: 26729427

Zhang SF, Zhang Z, Kong XB, Wang HB, Liu F. 2017. Dynamic changes in chemosensory gene expression during the *Dendrolimus punctatus* Mating Process. *Frontiers in Physiology* **8**:1127. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01127, PMID: 29375398

Zhang D-D, Löfstedt C. 2015. Moth pheromone receptors: gene sequences, function, and evolution. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3**:105. DOI: https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00105

Communication scientifique: Insect Chemical Ecology 2018 PhD course report

Insect Chemical Ecology: Chemical mediated interaction between plant-insect, and insect-insect, and novel applications in agriculture

Crispus Mbaluto[1*], Pascal M. Ayelo[2], Alexandra G. Duffy[3], Anna L. Erdei[4], Anaïs Tallon[5], Siyang Xia[6], Gabriela Caballero-Vidal[7], Urban Spitaler[8], Magdolna O. Szelényi[4], Gonçalo Duarte[9], William B. Walker III[5], Paul G. Becher[5]

[1]Molecular Interaction Ecology, Germany Center for Integrative Biodiversity Research, Leipzig Germany
[2]International Centre of Insect Physiology and Ecology (*icipe*) Nairobi, Kenya, and Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa
[3]Department of Biology, Evolutionary Ecology Laboratory, Brigham Young University, Provo, UT, USA
[4]Department of Zoology, Plant Protection Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
[5]Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp, Sweden
[6]Department of Ecology and Evolutionary Biology, Yale University, New Haven, CT, USA
[7]INRAE, Sorbonne Université, Institute of Ecology and Environmental Sciences of Paris, Paris and Versailles, France
[8]Division of Plant Protection, Research Centre Laimburg, South Tyrol, Ora, Italy, and Division of Plant Protection, Department of Crop Sciences, University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria
[9]LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

*Corresponding Author;
Crispus Mbaluto
Molecular Interaction Ecology,
Germany Center for Integrative Biodiversity Research, Leipzig Germany,
Deutscher Platz 5e, 04103 Leipzig, Germany
crispus.mbaluto@idiv.de

For more details about the ICE PhD course contact;
Paul G. Becher or William B Walker III
Department of Plant Protection Biology,
Swedish University of Agricultural Sciences,
Box 102, 23053 Alnarp, Sweden
Tel No: 040-415305
Email: Paul.Becher@slu.se / William.B.Walker.III@slu.se

Keywords: plant defense, tri-trophic interaction, chemical ecology, olfaction and odorant receptors, disease vectors, semiochemical

Insect chemical ecology (ICE) initially evolved as a discipline concerned with plant-insect interactions, and also with a strong focus on intraspecific pheromonal communication. Progress in this field has rendered a more complete picture of how insects exploit chemical signals in their surroundings (from hosts, mates, prey, and natural enemies) in order to effectively conduct their lives. Simultaneously, this progress has prompted new research questions about the evolution of insect chemosensation and the related ecological adaptations, and molecular mechanisms that mediate commonly observed behavioral plasticity, and the consequences of these interactions in different ecosystems. Themed meetings, workshops, and summer schools are ideal platforms for discussing scientific advancements as well as

identifying the gaps and challenges within the discipline. From the 11th to the 22nd of June 2018, the 11th annual PhD course in ICE was held at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) Alnarp, Sweden. The course was made up of 35 student participants from 22 nationalities (Fig 1) and was organized by William B. Walker III and Paul G. Becher of SLU Alnarp. Lectures and laboratory demonstrations were supported by literature seminars, and four broad research areas were covered: (1) Multitrophic interactions and plant defenses, (2) Chemical communication focusing on odor sensing, processing, and behavioral effects, (3) Disease vectors, and (4) Applied aspects of basic ICE research in agriculture. This particular article contains a synthesis of these main emergent themes and discussions from the ICE 2018 course.

Multitrophic interactions and plant defenses

A classical focus of ICE research has been the study of chemical defenses (allelochemicals) produced by plants in response to insect attacks. Several contributions explored interactions between a variety of crop species and different taxa of insect herbivores, plant-parasitic nematodes, and microbes. Data produced from organismal bioassays, molecular methods, and analytical chemistry reveal how aboveground (AG) and belowground (BG) interactions influence ecological processes.

The study of plant interactions with heterotrophic organisms was primarily focused on secondary metabolites that constitute the direct plant defenses (Fraenkel 1959; vanDam 2012; Zaynab et al. 2018). Whereas the functional role of secondary metabolites in direct defense is well established, in the last three decades, an explosion of interests in other chemical cues that mediate insect-plant communication culminated in the discovery of emissions of herbivore-induced plant volatiles (HIPV) (Rhoades 1983). HIPVs contribute to indirect plant defense, principally by recruiting natural enemies to insects. Moreover, it has been established that they also serve as signals for herbivorous insects in terms of mating site and host plant selection, oviposition and feeding behavior, informing insects of plants infested by con- and heterospecifics, and at times induce insect aggregation to overcome host plant defenses (Carrasco et al. 2015). In the attraction of AG natural enemies via HIPVs, several aspects can be explored from basic science to applied research. These include the influence of herbivore specific HIPVs and their meaning for prey and host selection or identification by predators and parasitoids (McCormick et al. 2012). Besides the impact of HIPVs on insect behavior, they can act as rapid and potent aerial priming agents that prepare systemic tissues of the same plant, and neighboring plants for incoming attacks. For example, herbivore-induced indole triggers an increase in the production of defensive volatiles in neighboring maize plants (Erb et al. 2015; Li and Blande 2017). Chemoecological interactions do not only occur AG, but BG dwellers also play critical roles in shaping biotic interactions within an ecosystem. A few examples presented in the AG-BG context showed that in roots, HIPV production could recruit natural enemies to root-feeding organisms in a comparable manner to AG systems (Rasmann et al. 2005; Degenhardt et al. 2009; Kivimäenpää et al. 2012; Ali et al. 2013).

Besides plant-insect herbivore interactions, the importance of microbial organisms in mediating a variety of biotic interactions was highlighted. Plants can indirectly interact with symbiotic as well as pathogenic microbes that co-exist with insects. While this area of ICE has recently come to the forefront of chemical ecology, exciting findings have been reported, but in some cases, their ecological relevance remains unclear. A diverse community of microbes live within the insects and enter the plant during feeding. It has also been shown that insect-associated microbes can directly induce or suppress plant defenses after an herbivorous attack. (Chung et al. 2013; Wang et al. 2017). Another perspective of insect-microbe associations is that microbes contribute to chemical defense against potential predators and pathogens. A recently described example is a symbiotic bacterium harbored by the tenebrionid beetle. This bacterium produces toxoflavin and caryoynencin, which protect the beetle's eggs from pathogens (Flórez et al. 2017). Other functions linked to microbes that need further examination include enabling insects to digest plant material as well as mediating insect adaptation to the abiotic environment. Yet, another perspective of insect-microbe interactions suggests that microbes attract insects through the emission of volatiles for dispersal (Becher et al. 2010, 2018).

Abiotic factors, mainly the changes in global temperatures and differences in nitrogen (N) levels, alter critical ecological processes. An increase in temperature can change the direct defenses such as

secondary and primary metabolites. For example, in grapes yards, an increase in temperature resulted in reduced production of anthocyanins and amino acids but an increase in tannins in grapes (Wu et al. 2019). Similarly, in several plant species, an increase in temperature triggers the release of high amounts of volatiles, for instance, terpenoids and phenolics (Kleist et al. 2012; Holopainen et al. 2018). On the other hand, increase in temperatures can accelerate insect metabolism and hence more feeding (Havko et al. 2019). Based on these examples the impact of temperature on the plant's secondary chemistry and insect metabolism it can be expected more voracious arthropods pest population will emerge (Havko et al. 2019). However, more studies are needed to provide details on how variations in temperature affect insect population dynamics and levels of plant damage. The availability of nutrients such as N is an essential factor determining secondary chemistry within plants, including Arabidopsis and tomato (Hoffland et al. 1999; Stewart et al. 2001). The changes in N-based metabolites in plants influence insect herbivores as well as their natural enemies. For example, a high C/N ratio resulted in elevated *α*-tomatine concentrations in tomato plants, and at the same time, the plants became more susceptible to pathogens (Hoffland et al. 1999). Moreover, high N content can positively impact on the abundance of natural enemies (Liman et al. 2017). Whether the attraction of natural enemies could be as a result of the emission of volatiles remains ambiguous. For omnivorous natural enemies, their high abundance on N-rich plants is attributed to the fact that their nutritional needs might be primarily met by the N-rich host plant (Liman et al. 2017). As a consequence, they can tend to be less interested in being predators. To this end, although only changes in temperature and nitrogen levels were discussed, future predictions highlight a plethora of new challenges that can only be deciphered via understanding how plants adapt to changing environments. Collectively, the body of studies discussed here demonstrate steady progress in understanding ICE and related fields, and that they have the potential to make sustainable contributions to the field of chemical ecology and applications in agriculture.

Insect chemical communication: signaling, sensing, processing and behavior among insects

As insects move through different complex and heterogeneous environments, they encounter a wide range of chemicals. Their chemosensory systems help them to detect the chemicals in their surroundings, for recognition of potential mates, prey, oviposition sites, food sources, and to avoid enemies or harmful resources. Sensing of chemical stimuli involves peripheral detection systems for odor recognition and central systems for odor processing to ultimately translate chemical information into behavior (Leal 2013).

The past 20 years have seen a steady increase in our understanding of insect olfaction. This began with the discovery of odorant receptors (ORs), gustatory receptors (GRs), and later the ionotropic receptors (IRs) as primary chemoreceptor proteins housed in dendritic membranes of the olfactory sensory neurons (OSN) (Montagné et al. 2015). Among the three receptor families, the ORs - primarily in the genetic model organism, *Drosophila melanogaster* - remains the most widely studied in terms of function (Dobritsa et al. 2003; Hallem et al. 2004; Mathew et al. 2013). Data produced using the model system has been instrumental in explaining evolutionary biology, across other insect species. For example, *Drosophila* antennae have been deployed as a heterologous expression system for identification of ORs from the noctuid moth *Spodoptera littoralis* that are responsive to components of the female-produced pheromone blend (Montagné et al. 2012), as well as those that are responsive to host-plant volatiles (de Fouchier et al. 2017).

A growing number of studies have linked the evolution of ORs in insect adaptation to new ecological niches. OR evolution via the birth and death process assumes genes are gained or lost through local genomic events (Vieira et al. 2007; Ramasamy et al. 2016). Moreover, the genes duplicates can remain in the genome and evolve novel functions, serving to associate insects with ecological adaptations. As an example, high birth and death rate of ORs in *D. suzukii* (Matsumura) resulted in reduced affinity for volatiles produced during fermentation and gained an affinity for short-chain esters found in fresh fruits substrate, which could be considered as an ecological adaptation to a specific niche (Ramasamy et al. 2016). In other studies, the evolution of OR56a in *Drosophila* flies is documented to confer identification and avoidance of unsuitable feeding and breeding sites (Stensmyr et al. 2012), while OR19a responds to signals from suitable substrates for oviposition (Dweck et al. 2013). These examples illustrate that some specific odorants are

only detected by a single receptor and are associated with crucial ecological adaptive roles. The contribution to speciation via changes in OR affinity for species-specific odors is another insufficiently understood aspect in insect olfaction. A recent study on *D. melanogaster* flies isolated from an ancestral sub-Saharan woodland habitat revealed that volatiles from marula fruit induces species-specific host and oviposition site selection by activating Or22a or Or19a, respectively (Mansourian et al. 2018). Interestingly, most Drosophila species from Southern Africa carry a specific allele at the Or22a/Or22b locus and are more sensitive to the marula ester ethyl isovalerate compared to the European *D. melanogaster* (Mansourian et al. 2018). The structural resolution of the insect OR co-receptor protein shines a light towards a better understanding of how ORs might interact with their odorant ligands (Butterwick et al. 2018; Zufall and Domingos 2018).

Whereas much of our knowledge on insect olfaction stems from studies using the *Drosophila* model or some moth species, additional means of chemosensation have been found in hymenopterans such as ants and bees. Particular studies on the desert ant (*Cataglyphis fortis* (Forel)) shows the development of a well-structured olfactory memory that enables the ant to remember important olfactory landmarks. Further, the ants utilize the acquired knowledge to pinpoint their nest entrance in spatial scale (Steck et al. 2009). Similar to findings in ants, studies, opinions, reviews, and syntheses show that bees quickly learn to associate with important odors for their lives, and the ability to do so is faster and more reliable than their ability to learn visual cues (Sandoz et al. 2007; Wright and Schiestl 2009; Arenas and Farina 2012; Chakroborty et al. 2015).

Investigations on odor coding, processing, and perception provide a global picture on the design of olfactory circuits that underlie the integration of behaviorally relevant olfactory information. A fundamental principle is that an odorant can activate a specific group of receptors (Carey and Carlson 2011). On the other hand, it is recognized that receptors which act as ‘generalist’ might also respond to overlapping groups of odorants, while ‘specialist’ responds to unitary or small sets of odorants (Carey and Carlson 2011). Thus, receptors include both broadly and narrowly tuned receptors consistent with dual information processing models of “labeled-line” and “combinatorial across-fiber coding” (Andersson et al. 2015). The insect sensory system seems to have evolved to function much like a spam filter; gating only signals that are necessary and sufficient for survival. However, how the already established olfactory layout might change during evolution remains to be studied in further detail. Furthermore, the field remains open for more discoveries due to the overwhelming number of insect species and the webs of interactions between them and their ever-changing environments. High throughput approaches such as genomics and transcriptomics based on next-generation sequencing are helping in the discovery and characterization of highly diverse chemoreception proteins and gene families (Montagné et al. 2015). Incorporation of molecular engineering approaches outside the “model system” can also provide immense new and relevant insights in chemical ecology. For instance, the CRISPR/Cas9 system has been demonstrated as a highly efficient genome editing approach to study olfactory gene functions in a noctuid pest (Koutroumpa et al. 2016). Also, the CRISPR/Cas9 methodology has been used to study olfactory genes in other insects, including locusts and ants, demonstrating a broad relevance of this technique for chemical ecology research (Li et al. 2016; Trible et al. 2017; Yan et al. 2017).

Insect vectors of diseases

Vector-borne infections account for 17 % of the human global infectious disease burden (National Academy of Science Engineering and Medicine 2016). That said, in recent years, studies on insect disease vectors have become an important branch of ICE. Chemical ecology approaches have opened opportunities to study and discover novel avenues to control insects that transmit disease-causing parasites. There are several disease vector organisms, including ticks (Estrada-Peña et al. 2013), sand-flies (Alkan et al. 2013), and mosquitoes that have attracted scientific attention (Leal et al. 2017). Here we focus on mosquitoes, which have gained much attention from diverse research areas such as medical entomology, genomics, among others. The search for oviposition sites by mosquitoes after a successful blood meal is a crucial option currently being investigated for insights on integrated insect control. Previous studies revealed that odorants govern mosquito oviposition site selection on increasingly fine spatial scales (Afify and Galizia 2015; Wondwosen et al. 2016, 2017). An interesting and recent report suggests a hierarchical habitat

preference by mosquitoes based on variations in vegetation chemical cues (Asmare et al. 2017a). Moreover, environmental cues such as carbon (C) and nitrogen (N) ratio in a substrate are partly linked to the breeding success of mosquitoes (Asmare et al. 2017b). Besides, there are still other open ecological questions regarding how climatic changes and CO_2 levels could explain shifts in oviposition site selection as well as geographic range expansion, and host preference over time.

Extrinsic and intrinsic factors guide the ability of mosquitoes to discriminate between different hosts (host preference). Studies on extrinsic factors mainly investigate the role of skin microbes and the associated chemical signals. Indeed, body odor largely depends on the composition of skin bacteria (Ghaninia et al. 2008; Verhulst et al. 2010, 2011). Besides the skin odor, the infection status of an individual can influence mosquito behavior; for example, the presence of malaria sickness elicits a stronger host attraction (Robinson et al. 2018). On the other hand, intrinsic factors such as variation in specific chemoreceptor proteins play an important role in host preference. A recent example stems from variations observed in the transcriptomes of the ancestral animal biting “forest” and human biting “domestic” forms of *Aedes aegypti* commonly found in tropical regions (McBride et al. 2014). The domestic form exhibits an increase in the expression and ligand sensitivity of the *Aaeg*Or4 gene, which explains the evolution of preference and specialization for human odors (McBride et al. 2014; McBride 2016). Despite such molecular progress in understanding these olfactory responses, and although the use of GCaMP to visualize neuronal activity is established (Tian et al. 2009), still the genetic and neural basis for host selection remains less explored. With recent developments towards near-perfect genome editing (CRISPR-Cas9 approach) it is possible to directly explore the genetics of insect disease vectors and molecular architecture of olfactory signaling, which gives great hope for investigating the integration of genetic and neural changes by central brain circuits relevant to host selection and other behaviors (Kistler et al. 2015).

Incorporating insect chemical ecology in diversified agroecosystems

The endeavor of agriculture requires sustainable crop protection methods for predictable and economical food production. For several decades, conventional pesticides have served the world well; however, for sustainable pest management, there is a need to replace these external applications with environmentally friendly crop protection approaches. To this end, ICE provides an in-depth understanding of the origin, functions, and significance of natural chemicals (hereafter referred to as semiochemicals) that mediate interactions between organisms such as plants and insect herbivores, insect herbivore and natural enemies, and tri-trophic interactions between plants and insects.

Semiochemicals provide a potential alternative to conventional pesticides (El-Shafie and Faleiro 2017; Mauchline et al. 2018). Sex pheromones of some Diptera, Lepidoptera, and Coleoptera species have been successfully used in pest control. As an example, the application of sex pheromones as mating disruptors and lures successfully reduced swede midge in Brassicaceae (Hillbur et al. 2005; Samietz et al. 2012). Similarly, sex pheromones from heliothine moths and codling moth (*Cydia pomonella*-Linnaeus) have been used successfully to disrupt mate location (Witzgall et al. 2010). In forests, aggregation pheromones of bark beetles (order; Coleoptera) are frequently used in trap-out methods (Gillette and Munson 2007). On the other hand, the use of pheromones and HIPVs to attract predators and parasitoids have been applied in crop fields and companion plants, and thus provide an additional novel alternative to exploit them in biological control (Turlings et al. 1990; Peñaflor and Bento 2013; Vosteen et al. 2016). For example, field application of the aphid alarm pheromone (E)-*β*-farnesene resulted in the recruitment of aphid parasitoids and predators (Vosteen et al. 2016). Moreover, the incorporation of methyl salicylate, a well-known HIPV, in controlled-release field dispensers attracts natural enemies to aphids in soybean and predators of spider mites in grapes and hops agroecosystems (James and Price 2004; Mallinger et al. 2011). Besides their use in pest management, pheromones are also reliably used as monitoring tools in biodiversity conservation. This has been demonstrated using sex pheromones of the saproxylic beetles, which successfully help to monitor the beetles in both managed and natural forest ecosystems (Musa et al. 2013). This highlights that insect pheromones are robust indicators of biodiversity and can revolutionize conservation efforts in diverse insect groups.

The role of pheromones, HIPVs, and other semiochemicals can be exploited to develop an effective and sustainable multidisciplinary approach for plant protection. A key example is the push-pull system in which the principal or target plant is protected by combination of two components; a source of repellent signals that reduce pest colonization and development “push” and a source of attractant cues “pull” include trap plants grown on the perimeter of the main crop and which attract the pest. The incorporation of semiochemicals in the context of push-pull cropping systems offers excellent potential for pest control in cases where external inputs provide insufficient control (Khan et al. 2010; Pickett et al. 2014). Along the same line, the use of engineered plants that produce a chemical compound of interest could be of critical advancement. For example, genes that regulate pheromone biosynthesis in insects were introduced in *Nicotiana benthamiana* leaves for the production of pheromonal components detectable to hundreds of moth species (Ding et al. 2014). Similarly, with recent advances in biochemistry and molecular genetics, it is also possible to engineer crops to produce terpenes for the attraction of natural enemies (Degenhardt et al. 2003).

Although the use of semiochemicals is a promising pest management strategy, there are challenges for their implementation in the real world. The registration of semiochemicals for biological controls can be a lengthy process or sometimes not granted. Another challenge is the lack of collaboration between ICE experts and industries. This limits opportunities to exploit the economic dynamics of the target semiochemical. Moreover, patents reduce chances for further investigations on novel findings. Lack of collaboration between research, extension officers, farmers, and semiochemical supply industries is another potential challenge. However, trials in South Tyrol and Trento regions in Italy collaboration between farmers, researchers, and the industrial sector confirms the successful implementation of semiochemicals (e.g., mating disruptors) in pest management (Anfora et al. 2009; Ioriatti et al. 2011).

Concluding remarks

Insects possess a unique capability to generate and recognize chemical cues and interact with a wide range of organisms in their environment. While these processes are only partly understood, ICE is a continuously growing and promising field of research to explain these natural ecological interactions. Advancements in methods and instrumentations are accelerating manipulation of the molecular architecture and chemical events underlying insect olfaction, communication, and crop metabolism. This is deepening our knowledge and helping to answer broader chemoecological and evolutionary questions, especially those linked to agriculture. Because ICE is an interdisciplinary field, the collaboration between professionals and early career scientists working in behavioral ecology, electrophysiology, analytical chemistry, molecular biology, data-driven science, and agriculture is vital. The ICE PhD course with its yearly organization rotating between SLU Alnarp in Sweden, Pennsylvania State University in Pennsylvania, USA, Max-Planck Institute of Chemical ecology (MPI-CE) in Jena, Germany, and since 2019, International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE) in Nairobi, Kenya is a successful avenue for students to gain insights into these ICE research areas (i.e., mentioned above). Besides, the course offers an opportunity to build bridges between disciplines, inspire new questions, and establish professional networks between participating students and lecturing scientists. We challenge the early career ICE scientists to follow and develop the present knowledge beyond their known borders.

Acknowledgments:

The ideas for this article were conceived during the insect chemical ecology annual PhD course in 2018 at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU, Alnarp, Sweden). We want to thank the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU, Alnarp, Sweden) for hosting and supporting the PhD course that allowed 35 participants to come together, learn and discuss different aspects within multiple disciplines in ICE research. All course participants acknowledge their home institutes, as well as their funding sources for allowing them to travel and participate in the course. Further, we thank all course lecturers for finding time to travel long distances to teach and share their experiences on various research

aspects of ICE. Also, we acknowledge Nicole M. van Dam for reviewing and providing useful comments to the summarized insights and ideas. Finally, we recognize and acknowledge the financial sponsorship of the course received from Bedoukian Research Inc.

Author contributions:

C. Mbaluto conceptually designed the structure of the report and compiled all sections of the report into a single draft, P. M. Ayelo, A.G. Duffy, A.L. Erdei, A. Tallon, S. Xia, G. Caballero-Vidal, U. Spitaler, M. O. Szelényi, and G. Duarte provided direct input to the writing process by summarizing topics and making corrections to the final draft of this article. W.B. Walker III and P.G. Becher proofread the draft article and contributed to the writing. All authors contributed to and approved the final version of the article.

Conflict of Interest:

All authors declare no conflict of interest

References

Afify A, Galizia CG (2015) Chemosensory cues for mosquito oviposition site selection. J Med Entomol 52:120–130. Doi.org/10.1093/jme/tju024

Ali JG, Campos-Herrera R, Alborn HT, et al (2013) Sending mixed messages: A trophic cascade produced by a belowground herbivore-induced cue. J Chem Ecol 39:1140–1147. Doi.org/10.1007/s10886-013-0332-x

Alkan C, Bichaud L, De Lamballerie X, et al (2013) Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Res 100:54–74. Doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.005

Andersson MN, Löfstedt C, Newcomb RD (2015) Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. Front Ecol Evol 3:. Doi.org/10.3389/fevo.2015.00053

Anfora G, Tasin M, De Cristofaro A, et al (2009) Synthetic grape volatiles attract mated *Lobesia botrana* females in laboratory and field bioassays. J Chem Ecol 35:1054–1062. Doi.org/10.1007/s10886-009-9686-5

Arenas A, Farina WM (2012) Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. Anim Behav 83:1023–1033. Doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.026

Asmare Y, Hill SR, Hopkins RJ, et al (2017a) The role of grass volatiles on oviposition site selection by *Anopheles arabiensis* and *Anopheles coluzzii*. Malar J 16:65. Doi.org/10.1186/s12936-017-1717-z

Asmare Y, Hopkins RJ, Tekie H, et al (2017b) Grass pollen affects survival and development of larval *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). J Insect Sci 17:1–8. Doi.org/10.1093/jisesa/iex067

Becher PG, Bengtsson M, Hansson BS, Witzgall P (2010) Flying the fly: Long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. J Chem Ecol 36:599–607. Doi.org/10.1007/s10886-010-9794-2

Becher PG, Hagman A, Verschut V, et al (2018) Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. Ecol Evol 8:2962–2974. Doi.org/10.1002/ece3.3905

Butterwick JA, del Mármol J, Kim KH, et al (2018) Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. Nature 560:447–452. Doi.org/10.1038/s41586-018-0420-8

Carey AF, Carlson JR (2011) Insect olfaction from model systems to disease control. Proc Natl Acad Sci 108:12987–12995. Doi.org/10.1073/pnas.1103472108

Carrasco D, Larsson MC, Anderson P (2015) Insect host plant selection in complex environments. Curr Opin Insect Sci 8:1–7. Doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.014

Chakroborty NK, Bienefeld K, Menzel R (2015) Odor learning and odor discrimination of bees selected for enhanced hygienic behavior. Apidologie 46:499–514. Doi.org/10.1007/s13592-014-0342-x

Chung SH, Rosa C, Scully ED, et al (2013) Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. Proc Natl Acad Sci 110:15728–15733. Doi.org/10.1073/pnas.1308867110

de Fouchier A, Walker III WB, Montagné N, et al (2017) Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. Nat Commun 8:15709. Doi.org/10.1038/ncomms15709

Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT, Kessler A (2003) Attracting friends to feast on foes: Engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. Curr Opin Biotechnol 14:169–176. Doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00025-9

Degenhardt J, Hiltpold I, Köllner TG, et al (2009) Restoring a maize root signal that attracts insect-killing nematodes to control a major pest. Proc Natl Acad Sci 106:13213–13218. Doi.org/10.1073/pnas.0906365106

Ding B-J, Hofvander P, Wang H-L, et al (2014) A plant factory for moth pheromone production. Nat Commun 5:1–7. Doi.org/10.1038/ncomms4353

Dobritsa A, van der Goes van Naters W, Warr C, et al (2003) Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the Drosophila Antenna. Neuron 37:827–841. Doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00094-1

Dweck HKM, Ebrahim SAM, Kromann S, et al (2013) Olfactory preference for egg laying on citrus substrates in Drosophila. Curr Biol 23:2472–2480. Doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.047

El-Shafie HAF, Faleiro JR (2017) Semiochemicals and thier potential use in pest management. In: Shields VDC (ed) Biological control of pest and vector insects. InTech, Rijeka, Croatia, pp 3–22

Erb M, Veyrat N, Robert CAM, et al (2015) Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. Nat Commun 6:1–10. Doi.org/10.1038/ncomms7273

Estrada-Peña A, Gray J, Kahl O, et al (2013) Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3 (29):1–12

Flórez L V, Scherlach K, Gaube P, et al (2017) Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. Nat Commun 8:15172. Doi.org/10.1038/ncomms1517

Fraenkel GS (1959) The raison d'Etre of secondary plant substances. Science (80-) 129:1466–1470. Doi.org/10.1126/science.129.3361.1466

Ghaninia M, Larsson M, Hansson BS, Ignell R (2008) Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. J Exp Biol 211:3020—3027. Doi.org/10.1242/jeb.016360

Gillette NE, Munson AS (2007) Semiochemical sabotage : Behavioral chemicals for protection of western conifers from bark beetles. In: J.L. Hayes, Lundquist JE (eds) Proceedings of a symposium at the 2007 society of American Foresters Conference. United States Department of Agriculture, Portland, Oregon, pp 85–110

Hallem EA, Ho MG, Carlson JR (2004) The molecular basis of odor coding in the Drosophila Antenna. Cell 117:965–979. Doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.012

Havko NE, Das MR, Mcclain AM, et al (2019) Insect herbivory antagonizes leaf cooling responses to elevated temperature in tomato. Proc Natl Acad Sci 1–7. Doi.org/10.1073/pnas.1913885117

Hillbur Y, Celander M, Baur R, et al (2005) Identification of the sex pheromone of the swede midge, C*ontarinia nasturtii*. J Chem Ecol 31:1807—1828. Doi.org/10.1007/s10886-005-5928-3

Hoffland E, van Beusichem ML, Jeger MJ (1999) Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. Plant Soil 210:263–272. Doi.org/10.1023/A:1004661913224

Holopainen JK, Virjamo V, Ghimire RP, et al (2018) Climate change effects on secondary compounds of forest trees in the northern hemisphere. Front. Plant Sci. 9(1445):1–19

Ioriatti C, Anfora G, Tasin M, et al (2011) Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). J Econ Entomol 104:1125–1137. Doi.org/10.1603/EC10443

James DG, Price TS (2004) Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. J Chem Ecol 30:1613–1628. Doi.org/10.1023/B:JOEC.0000042072.18151.6f

Khan ZR, Midega CAOO, Bruce TJAA, et al (2010) Exploiting phytochemicals for developing a "push-pull" crop protection strategy for cereal farmers in Africa. J Exp Bot 61:4185–4196.

Doi.org/10.1093/jxb/erq229
Kistler KE, Vosshall LB, Matthews BJ (2015) Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. Cell Rep 11:51–60. Doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.009
Kivimäenpää M, Magsarjav N, Ghimire R, et al (2012) Influence of tree provenance on biogenic VOC emissions of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stumps. Atmos Environ 60:477–485. Doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.07.018
Kleist E, Mentel TF, Andres S, et al (2012) Irreversible impacts of heat on the emissions of monoterpenes, sesquiterpenes, phenolic BVOC and green leaf volatiles from several tree species. Biogeosciences 9:5111–5123. Doi.org/10.5194/bg-9-5111-2012
Koutroumpa FA, Monsempes C, François M-C, et al (2016) Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. Sci Rep 6:1–9. Doi.org/10.1038/srep29620
Leal HM, Hwang JK, Tan K, Leal WS (2017) Attraction of Culex mosquitoes to aldehydes from human emanations. Sci Rep 7:1–10. Doi.org/10.1038/s41598-017-18406-7
Leal WS (2013) Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. Annu Rev Entomol 58:373–391. Doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635
Li T, Blande JD (2017) How common is within-plant signaling via volatiles? Plant Signal Behav 12:1–3. Doi.org/10.1080/15592324.2017.1347743
Li Y, Zhang J, Chen D, et al (2016) CRISPR/Cas9 in locusts: Successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor (Orco). Insect Biochem Mol Biol 79:27–35. Doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.003
Liman A-S, Dalin P, Björkman C (2017) Enhanced leaf nitrogen status stabilizes omnivore population density. Oecologia 183:57–65. Doi.org/10.1007/s00442-016-3742-y
Mallinger RE, Hogg DB, Gratton C (2011) Methyl Salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. J Econ Entomol 104:115–124. Doi.org/10.1603/EC10253
Mansourian S, Enjin A, Jirle E V, et al (2018) Report Wild African *Drosophila melanogaster* Are Seasonal Specialists on Marula Fruit. Curr Biol 28:1–9. Doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.033
Mathew D, Martelli C, Kelley-Swift E, et al (2013) Functional diversity among sensory receptors in a Drosophila olfactory circuit. Proc Natl Acad Sci 110:2134–2143. Doi.org/10.1073/pnas.1306976110
Mauchline AL, Hervé MR, Cook SM (2018) Semiochemical-based alternatives to synthetic toxicant insecticides for pollen beetle management. Arthropod Plant Interact 12:835–847. Doi.org/10.1007/s11829-017-9569-6
McBride CS (2016) Genes and odors underlying the recent evolution of mosquito preference for humans. Curr Biol 26:R41–R46. Doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.032
McBride CS, Baier F, Omondi AB, et al (2014) Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. Nature 515:222. Doi: 10.1038/nature13964
McCormick AC, Unsicker SB, Gershenzon J (2012) The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. Trends Plant Sci 17:303–310. Doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.012
Montagné N, Chertemps T, Brigaud I, et al (2012) Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth *Spodoptera littoralis* by heterologous expression in Drosophila. Eur J Neurosci 36:2588–2596. Doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08183.x
Montagné N, de Fouchier A, Newcomb RD, Jacquin-Joly E (2015) Chapter Three - Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. In: Glatz RBT-P in MB and TS (ed) Molecular Basis of Olfaction, 1st edn. Academic Press, pp 55–80
Musa N, Andersson K, Burman J, et al (2013) Using sex pheromone and a multi-scale approach to predict the distribution of a rare saproxylic beetle. PLoS One 8:. Doi.org/10.1371/journal.pone.0066149
National Academy of Science Engineering and Medicine (2016) Global health impacts of vector-borne diseases: workshop summary. The National Academies Press, Washington, DC
Peñaflor MFG V, Bento JMS (2013) Herbivore-induced plant volatiles to enhance biological control in agriculture. Neotrop Entomol 42:331–343. Doi.org/10.1007/s13744-013-0147-z
Pickett JA, Woodcock CM, Midega CAO, Khan ZR (2014) Push-pull farming systems. Curr Opin Biotechnol

26:125–132. Doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.006
Ramasamy S, Ometto L, Crava CM, et al (2016) The evolution of olfactory gene families in Drosophila and the genomic basis of chemical-ecological adaptation in *Drosophila suzukii*. Genome Biol Evol 8:2297–2311. Doi.org/10.1093/gbe/evw160
Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, et al (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. Nature 434:732. Doi.org/10.1038/nature03451
Rhoades DF (1983) Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: Evidence for pheromonal sensitivity of willows. In: PA Hedin (ed) Plant Resistance to Insects. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Washington, DC, pp 55–68
Robinson A, Busula AO, Voets MA, et al (2018) Plasmodium-associated changes in human odor attract mosquitoes. Proc Natl Acad Sci 115:E4209 LP-E4218. Doi.org/10.1073/pnas.1721610115
Samietz J, Baur R, Hillbur Y (2012) Potential of synthetic sex pheromone blend for mating disruption of the swede midge, *Contarinia nasturtii*. J Chem Ecol 38:1171–1177. Doi.org/10.1007/s10886-012-0180-0
Sandoz J-C, Deisig N, De Brito Sanchez MG, Giurfa M (2007) Understanding the logics of pheromone processing in the honeybee brain: from labeled-lines to across-fiber patterns. Front. Behav. Neurosci. 5:1–12
Steck K, Hansson BS, Knaden M (2009) Smells like home: Desert ants, *Cataglyphis fortis*, use olfactory landmarks to pinpoint the nest. Front Zool 6:5. Doi.org/10.1186/1742-9994-6-5
Stensmyr MC, Dweck HKM, Farhan A, et al (2012) A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in drosophila. Cell 151:1345–1357. Doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.046
Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, et al (2001) The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. Plant Cell Environ 24:1189–1197. Doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00768.x
Tian L, Hires SA, Mao T, et al (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. Nat Methods 6:875. Doi.org/10.1038/nmeth.1398
Trible W, Olivos-Cisneros L, McKenzie SK, et al (2017) orco Mutagenesis causes loss of antennal lobe glomeruli and impaired social behavior in ants. Cell 170:727-735.e10. Di.org/10.1016/j.cell.2017.07.001
Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. Science (80-) 250:1251–1253. Doi.org/10.1126/science.250.4985.1251
vanDam NM (2012) Phytochemicals as mediators of aboveground-belowground interactions in plants. In: Iason GR, Dicke M, Hartley SE (eds) The ecology of plant secondary metabolites. Cambridge University Press, Cambridge, pp 190–203
Verhulst NO, Andriessen R, Groenhagen U, et al (2010) Differential attraction of malaria mosquitoes to volatile blends produced by human skin bacteria. PLoS One 5:e15829. Doi.org/10.1371/journal.pone.0015829
Verhulst NO, Qiu YT, Beijleveld H, et al (2011) Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. PLoS One 6:e28991. Doi.org/10.1371/journal.pone.0028991
Vieira FG, Sánchez-Gracia A, Rozas J (2007) Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 Drosophila genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. Genome Biol 8:235.1-235.16. Doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r235
Vosteen I, Weisser WW, Kunert G (2016) Is there any evidence that aphid alarm pheromones work as prey and host finding kairomones for natural enemies? Ecol Entomol 41:1–12. Doi.org/10.1111/een.12271
Wang J, Peiffer M, Hoover K, et al (2017) *Helicoverpa zea* gut-associated bacteria indirectly induce defenses in tomato by triggering a salivary elicitor(s). New Phytol 214:1294–1306. Doi.org/10.1111/nph.14429
Witzgall P, Kirsch P, Cork A (2010) Sex pheromones and their impact on pest management. J Chem Ecol 36:80–100. Doi.org/10.1007/s10886-009-9737-y
Wondwosen B, Birgersson G, Seyoum E, et al (2016) Rice volatiles lure gravid malaria mosquitoes, *Anopheles arabiensis*. Sci Rep 6:37930. Doi.org/10.1038/srep37930
Wondwosen B, Hill SR, Birgersson G, et al (2017) A(maize)ing attraction: gravid *Anopheles arabiensis* are

attracted and oviposit in response to maize pollen odours. Malar J 16:39. Doi.org/10.1186/s12936-016-1656-0

Wright GA, Schiestl FP (2009) The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. Funct Ecol 23:841–851. Doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x

Wu J, Drappier J, Hilbert G, et al (2019) The effects of a moderate grape temperature increase on berry secondary metabolites. OENO One 53:321–333. Doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.2.2434

Yan H, Opachaloemphan C, Mancini G, et al (2017) An engineered orco mutation produces aberrant social behavior and defective neural development in ants. Cell 170:736-747.e9. Doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.051

Zaynab M, Fatima M, Abbas S, et al (2018) Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microb Pathog 124:198–202. Doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034

Zufall F, Domingos AI (2018) The structure of Orco and its impact on our understanding of olfaction. J Gen Physiol 150:1602–1605. Doi.org/10.1085/jgp.201812226

List of figures

Fig. 1 Insect chemical Ecology PhD course participants and organizers at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Alnarp Sweden)



Title : Reverse chemical ecology applied to odorant receptors in the crop pest insect *Spodoptera littoralis*: towards innovative strategies in crop protection

Keywords : *Spodoptera littoralis*, crop pest, caterpillar, semiochemicals, odorant receptors, transcriptome, electrophysiology, *in silico* modeling, behavior.

Abstract :

Insects detect, via their odorant receptors (OR), a variety of volatile compounds found in the environment and use them to carry out vital activities such as identifying food sources and sexual partners. The identification of attractive or repellent semiochemicals that interfere with crop pest behaviors is a major issue for their biocontrol. Yet, their application for the control of pest Lepidoptera mainly targets adults, whereas the caterpillars represent the feeding stage.

In this context, my work consisted in searching semiochemicals active on the behavior of caterpillars in a model crop pest, the moth *Spodoptera littoralis*, using a reverse chemical ecology targeting the larval ORs. First, a transcriptomic study allowed us to identify the repertoire of chemosensory genes expressed in the larva. Then, the function of some ORs was determined via their heterologous expression in *Drosophila*, in order to identify which olfactory cues are detected by larvae. Last, we combined *in silico* ligand-targeted modeling, functional analyzes of ORs expressed in *Drosophila* and behavioral assays to identify new ligands for the targeted ORs that are active on the larval behavior.

This work validates the use of ORs as targets to accelerate the discovery of new semiochemicals active on behaviors, which, in the long term could be used for the bioncontrol of herbivorous caterpillars. The data obtained also provide fundamental knowledge in the field of neurobiology and the ethology of larvae.

Titre : Écologie chimique inverse appliquée aux récepteurs olfactifs de l'insecte ravageur des cultures *Spodoptera littoralis* : vers des stratégies innovantes en protection des cultures

Mots-clés : *Spodoptera littoralis*, ravageur, chenille, sémiochimiques, récepteurs olfactifs, transcriptome, électrophysiologie, modélisation *in silico*, comportement.

Résumé :

Les insectes détectent, grâce à leurs récepteurs olfactifs (OR), une diversité de composés volatils présents dans l'environnement, qu'ils utilisent pour des activités vitales comme l'identification des sources de nourritures et des partenaires sexuels. Identifier des sémiochimiques qui ont un effet attractif ou répulsif est un enjeu pour manipuler le comportement des insectes nuisibles à des fins de biocontrôle. Appliquées aux Lépidoptères, de telles stratégies visent essentiellement les adultes, alors que le stade ravageur est principalement la chenille.

Ainsi mon travail de thèse a consisté à rechercher des sémiochimiques actifs sur le comportement des chenilles chez un ravageur modèle, la noctuelle *Spodoptera littoralis*, en mettant en œuvre une approche d'écologie chimique inverse à partir des OR. Tout d'abord, une étude transcriptomique a permis d'identifier le répertoire des gènes chimiosensoriels exprimés chez la chenille. Nous avons ensuite étudié la fonction de certains récepteurs en utilisant un système d'expression hétérologue *in vivo* chez la drosophile, afin d'identifier quels sont les volatils détectés par l'insecte. Enfin, nous avons combiné des approches de modélisation *in silico* ligand-ciblée, des analyses fonctionnelles *in vivo* chez la drosophile et des tests comportementaux, afin d'identifier de nouveaux ligands des OR ciblés actifs sur le comportement.

Ce travail a permis de valider l'utilisation des OR pour accélérer la découverte de nouveaux sémiochimiques actifs sur les comportements qui, à terme, pourraient servir au bioncontrôle des chenilles herbivores. Les données obtenues apportent également des connaissances fondamentales dans le domaine de la neurobiologie et de l'éthologie des larves.