



HAL
open science

Dynamique des phases de mémoire et réseaux neuronaux chez *Drosophila melanogaster*

Julien Séjourné

► **To cite this version:**

Julien Séjourné. Dynamique des phases de mémoire et réseaux neuronaux chez *Drosophila melanogaster*. Neurosciences [q-bio.NC]. Paris 6, 2009. Français. NNT: . pastel-00567093

HAL Id: pastel-00567093

<https://pastel.hal.science/pastel-00567093>

Submitted on 18 Feb 2011

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.

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité
NEUROSCIENCES
ED158 : Cerveau Cognition Comportement

Présentée par

Julien Séjourné

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Dynamique des phases de mémoire et réseaux neuronaux
chez *Drosophila melanogaster***

Soutenue le 24 septembre 2009

devant le jury composé de :

Dr. Ann LOHOF , Université Paris VI (Paris)	Président
Dr. Jean-Maurice DURA , CNRS (IGH, Montpellier)	Rapporteur
Pr. Martin GIURFA , Université Paul Sabatier (CRCA, Toulouse)	Rapporteur
Dr. Hervé TRICOIRE , Université Paris 7 (IJM, Paris)	Examineur
Dr. Guillaume ISABEL , ESPCI-CNRS (Paris)	Examineur
Dr. Thomas PREAT , ESPCI-CNRS (Paris)	Directeur de Thèse

Remerciements



En construction

Résumé

Comment les différentes phases de mémoire interagissent-elles ? Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la formation de la mémoire consolidée ? *Drosophila melanogaster* s'avère être un excellent modèle pour l'étude des mécanismes neurologiques de l'apprentissage et de la mémoire car, malgré la relative simplicité de son cerveau, elle est capable d'apprentissages variés et performants. Ainsi, un protocole de conditionnement pavlovien associant une odeur à des chocs électriques permet la formation d'une mémoire olfactive aversive. Un cycle unique de conditionnement induit la formation d'une mémoire labile ne durant que quelques heures, alors que cinq cycles de conditionnement espacés avec un intervalle de repos induisent la formation de la mémoire à long terme (MLT). La MLT est une mémoire consolidée et dépendante d'une synthèse protéique *de novo*. Une autre forme de mémoire consolidée, la mémoire résistante à l'anesthésie (MRA), est formée après un cycle ou plusieurs cycles de conditionnement massés. Même si les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des mémoires labiles et de la MLT commencent à être relativement bien caractérisés, ceux de la MRA restent largement inconnus à ce jour, peu de mutants pour ce type de mémoire ayant été identifiés. Par ailleurs, les relations entre les deux formes de mémoire consolidée restaient à définir, certains modèles proposant que ces deux formes de mémoire coexistent après un conditionnement espacé, alors que notre équipe a suggéré que la MRA et la MLT étaient exclusives.

Pendant ma thèse, j'ai recherché de nouveaux mutants de MRA afin d'essayer de répondre à ces questions. Le criblage après conditionnement de lignées homozygotes portant un élément transposable P(Gal4) a permis d'identifier un nouveau mutant de MRA, *memory-gating-defective* (*megad*). Le gène *megad* code un transporteur aux acides monocarboxyliques, tel que le lactate. Chez la souche sauvage la protéine Megad est exprimée dans le centre de la mémoire olfactive, les corps pédonculés (CPs), où elle pourrait jouer un rôle dans l'approvisionnement énergétique de certains neurones lors de la formation de la MRA. L'inhibition de l'expression de *megad* uniquement dans les CPs de l'adulte induit un défaut de MRA, indiquant que ce gène joue un rôle physiologique dans la formation de cette mémoire. Au contraire après un conditionnement espacé le mutant *megad* présente une performance mnésique normale, confirmant l'hypothèse proposée au laboratoire selon laquelle la MRA n'est plus détectée après un conditionnement espacé. Pourquoi la MRA est-elle effacée ou bloquée après un conditionnement espacé ? Nous montrons que la formation de la MLT est facilitée chez le mutant *megad* puisqu'elle se forme après trois seulement trois cycles de conditionnement espacés, alors qu'il en faut au moins 5 chez la souche sauvage. Ce résultat important suggère que la présence de la MRA contrôle chez la souche sauvage la formation de la MLT, empêchant cette mémoire coûteuse en énergie de se former après un conditionnement unique.

Les rôles des CPs ainsi que de certains réseaux neuronaux extrinsèques aux CPs dans la mémorisation olfactive ont été bien caractérisés ces dernières années. Néanmoins, il n'est pas connu comment la trace mnésique sort des CPs lors du rappel mnésique. Dans le but de répondre à cette question j'ai criblé des neurones extrinsèques aux CPs à l'aide d'une toxine thermosensible permettant une inactivation spécifique et conditionnelle de ces neurones. J'ai ainsi montré que les neurones MB-V2, qui sont efférents aux lobes verticaux des CPs, sont impliqués dans le rappel de toutes les formes de mémoire olfactive aversive. De plus la neurotransmission des neurones MB-V2 n'est requise ni pendant l'apprentissage ni pendant la consolidation mnésique. Les neurones MB-V2 projettent sur la corne latérale, une structure impliquée dans l'évitement aux odeurs aversives chez les mouches naïves. Ainsi, pendant le rappel de la mémoire olfactive aversive, la trace mnésique présente dans les CPs activerait les neurones MB-V2 qui renforceraient, via la corne latérale, la voie naturelle d'évitement de l'odeur.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Table des matières	4
Index des figures	8
Introduction	10
1 Généralités	10
1.1 La mémoire	10
1.2 Intérêt de la drosophile	12
1.2.1 Premiers outils.....	12
1.2.2 Le système Gal4/UAS.....	13
1.2.3 Contrôle spatio-temporel de l'expression d'un gène	14
1.2.4 Contrôle de l'expression d'un gène par ARN interférence	15
1.2.5 Contrôle localisé de l'activité neuronale.....	16
1.2.6 Imagerie <i>in vivo</i>	17
1.3 La mémoire chez la Drosophile	18
1.3.1 Protocole expérimental	18
1.3.2 Intérêt du conditionnement associatif aversif.....	20
1.3.3 Différents types de conditionnement induisent la formation de différents types de mémoire	20
1.4 Anatomie morphologique et fonctionnelle	22
1.4.1 Présentation générale du système nerveux central.....	22
1.4.2 Les corps pédonculés font partie du protocérébrum.....	23
1.4.3 Le deutocérébrum	26
1.4.4 Le tritocérébrum	26
2 La formation des mémoires à court terme	26
2.1 Intégration des informations olfactives	26
2.1.1 Détection des molécules odorantes.....	26
2.1.2 Les lobes antennaires sont le centre olfactif primaire	27
2.1.3 Les corps pédonculés et le protocérébrum latéral sont les centres olfactifs secondaires	27
2.1.4 Traitement de l'information olfactive dans les corps pédonculés	29

2.2	Intégration du stimulus inconditionnel.....	30
2.2.1	Les neurones dopaminergiques sont requis pour l'apprentissage aversif.....	30
2.2.2	Les neurones octopaminergiques sont requis pour l'apprentissage appétitif.....	32
2.3	Intégration de l'odeur et des chocs électriques dans les corps pédonculés.....	32
2.3.1	Mécanismes moléculaires de formation de la mémoire à court terme.....	33
2.3.2	Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire à court terme.....	37
2.4	La mémoire à moyen terme.....	41
2.4.1	Mécanismes moléculaires de la formation de la mémoire à moyen terme.....	42
2.4.2	Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire à moyen terme.....	42
3	Les mémoires consolidées.....	45
3.1	Mémoire résistante à l'anesthésie.....	45
3.1.1	Mécanismes moléculaires de formation des mémoires consolidées.....	45
3.1.2	Mécanismes cellulaires de formation de la mémoire résistante à l'anesthésie.....	46
3.2	Mémoire à long terme.....	47
3.2.1	Mécanismes moléculaires de formation de la mémoire à long terme.....	47
3.2.2	Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la MLT.....	50
3.3	Dynamique des phases de mémoire.....	51
	Matériel et Méthodes.....	56
1	Génétique.....	56
2	Comportement.....	56
2.1	Conditionnement aversif olfactif classique.....	56
2.2	Gene-Switch.....	58
2.3	<i>shibire^{ts}</i>	58
2.4	Test de l'olfaction.....	59
2.5	Evitement aux chocs électriques.....	59
3	Biologie moléculaire.....	59
3.1	Extraction d'ADN.....	59
3.2	Digestion/ligation.....	60
3.3	Transformation et séquençage.....	60
4	Histologie.....	61
4.1	Coupes paraffines.....	61
4.2	Immunohistochimie.....	61
	Résultats.....	63

1	Identification d'un nouveau mutant de mémoire résistante à l'anesthésie	63
1.1	Crible.....	63
1.2	Article I : <i>Megad</i> gates long-term Memory formation in <i>Drosophila</i>	69
1.3	Données supplémentaires.....	92
1.3.1	Les lignées <i>NP2310</i> et <i>E02338</i> affectant <i>megad</i> présentent des défauts de MRA et de MLT	92
1.3.2	L'inhibition constitutive de <i>megad</i> par ARNi affecte la MRA et la MLT.....	94
1.3.3	L'inhibition conditionnelle de <i>megad</i> au stade adulte dans tous les neurones affecte spécifiquement la MRA.....	96
1.3.4	La sur-expression de <i>megad</i> n'affecte pas la MRA.....	97
2	Identification de neurones extrinsèques aux corps pédonculés impliqués dans la mémoire olfactive aversive.....	99
2.1	Crible de neurones extrinsèques aux corps pédonculés.....	99
2.1.1	Crible originel	99
2.1.2	Etude de la MLT dans les lignées identifiées.....	103
2.1.3	Contrôles olfactifs.....	104
2.2	Article II : Mushroom Body Efferent MB-V2 Neurons Are Required For Aversive Olfactory Memory Retrieval In <i>Drosophila</i>	106
2.3	Les neurones DPM sont impliqués dans le rappel de la mémoire à long terme.....	127
2.3.1	Profil d'expression de la lignée <i>NP677</i>	127
2.3.2	La neurotransmission des neurones DPM est requise pendant le rappel de la mémoire à long terme.....	129
2.3.3	La neurotransmission des neurones DPM n'est pas requise pendant le rappel de la mémoire résistante à l'anesthésie et de la mémoire à moyen terme.....	130
2.3.4	Le gène <i>delta</i> ne semble pas impliqué dans la formation de la MLT.....	133
2.3.5	Conclusion	134
2.4	Les neurones marqués dans les lignées <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i> sont impliqués dans la mémoire aversive.....	135
2.4.1	Profil d'expression des lignées <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i>	135
2.4.2	Les neurones marqués dans <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i> sont impliqués dans le rappel de la MLT	137
2.4.3	Les neurones marqués dans <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i> sont impliqués dans le rappel de la MRA	139
2.4.4	Les neurones marqués dans la lignée <i>NP689</i> sont impliqués pendant un apprentissage massé	140

2.4.5 Le blocages des neurones marqués dans <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i> n'affecte pas la mémoire à 2 heures	141
Discussion	144
1 Réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire olfactive.....	144
1.1 Les neurones MB-V2 sont impliqués dans le rappel de la mémoire aversive	145
1.2 Rôle des neurones révélés dans les lignées <i>MZ0604</i> et <i>NP689</i> dans la mémoire olfactive.....	151
1.3 Rôle des neurones DPM dans le rappel de la MLT.....	151
2 Identification d'un nouveau mutant de mémoire résistante à l'anesthésie et dynamique des phases de mémoire.	154
2.1 Identification de <i>megad</i> , un nouveau mutant de MRA	157
2.2 Dynamique des phases de mémoire chez d'autres espèces.....	160
2.3 Rôle putatif de <i>megad</i> dans la formation de la MRA	165
2.4 Perspectives.....	170
3 Conclusion générale	171
Bibliographie.....	172

Index des figures

Figure 1: Le système Gal4/UAS.	13
Figure 2 : Les systèmes GAL80 ^{ts} et Switch-GAL4/UAS permettent de séparer les effets développementaux des effets physiologiques chez l'adulte.	15
Figure 3 : Mécanisme de l'ARN interférence.	12
Figure 4 : L'expression de la protéine thermosensible Shi ^{ts} permet de contrôler l'activité ds neurones.	17
Figure 5 : Exemple de sondes FRET ratiométriques pour les Rho GTPases (Raichu-RhoA)	14
Figure 6 : Paradigme expérimental du conditionnement olfactif aversif.	19
Figure 7 : La mémoire formée après un cycle de conditionnement est composée d'une mémoire sensible à l'anesthésie et d'une mémoire résistante à l'anesthésie.	21
Figure 8 : Différents protocoles induisent différents types de mémoire.	22
Figure 9 : Représentation schématique du cerveau de drosophile.	24
Figure 10 : Représentation schématique des lobes antennaires et des corps pédonculés.	25
Figure 11 : Représentation schématique des neurones de projection.	28
Figure 12 : Schéma du système olfactif de la drosophile.	29
Figure 13 : Profils d'expression des neurones dopaminergiques et du récepteur dDa1.	31
Figure 14 : Schéma de la voie AMPC/PKA dans les cellules de Kenyon	37
Figure 15 : Les neurones α/β et γ sont requis pendant le rappel des mémoires à court terme.	39
Figure 16: Les mutants ala présentent des défauts anatomiques des corps pédonculés.	39
Figure 17 : Morphologie du neurone APL GABAergique.	37
Figure 18 : Les neurones DPM projettent sur les corps pédonculés avec un unique neurite.	39
Figure 19 : La MRA est normale dans le mutant rut et est effacée après un conditionnement espacé.	52
Figure 20 : Dynamique des phases de mémoire.	49
Figure 21 : « Résultat du crible de mutants de ARM.	64
Figure 22 : Résultats du crible de mutants de ARM après homogénéisation du fonds génétique.	65
Figure 23 : Etude de la MLT des mutants identifiés lors du crible.	66
Figure 24 : Contrôle de l'olfaction des mutants identifiés lors du crible.	67
Figure 25 : Contrôle de l'évitement aux chocs électriques des mutants identifiés lors du crible.	67
Figure 26 : Etude de la MRA chez les mutants identifiés lors du crible.	68
Figure 27 : Les lignées homozygotes NP2310 et E02338 présentent des défauts de MRA et de MLT à 24 heures.	93
Figure 28 : La lignée homozygote NP2310 présente une malformation des lobes α' des CPs.	94
Figure 29 : La MRA est affectée par l'expression du RNAi megad 1 selon le pilote d'expression de GAL2805.	95
Figure 30 : La MLT est affectée par l'expression de l'ARNi megad 1 selon le pilote d'expression de GAL2805.	96
Figure 31 : Le gène megad joue un rôle physiologique dans la formation de la MRA.	97
Figure 32 : La surexpression du gène megad dans les CPs de mouches adultes n'a pas d'effet sur la MRA.	98
Figure 33 : Résultats du crible après homogénéisation du fonds génétique.	103
Figure 34 : Contrôles olfactifs.	104
Figure 35 : Profil d'expression de la lignée NP2583.	103

<i>Figure 36 : Profil d'expression de la lignée NP677.</i>	128
<i>Figure 37 : Les lignées C316 et NP677 marquent les neurones DPM.</i>	128
<i>Figure 38 : Un défaut de MLT est observé lorsque la neurotransmission des neurones DPM est bloquée pendant le rappel.</i>	129
<i>Figure 39 : La MLT est normale lorsque les neurones DPM ne sont pas bloqués pendant le test.</i>	130
<i>Figure 40 : La MRA est normale lorsque les neurones DPM sont bloqués pendant le test.</i>	131
<i>Figure 41 : La restitution de la MRA à 24 heures ne requiert pas la neurotransmission des neurones DPM après un cycle de conditionnement.</i>	132
<i>Figure 42 : La mémoire à 2 heures est normale lorsque les neurones DPM sont bloqués pendant le test.</i>	133
<i>Figure 43 : La MLT est normale lorsque le gène Delta est inhibé dans tous les neurones d'une mouche adulte.</i>	134
<i>Figure 44 : Profil d'expression de la lignée MZ0604.</i>	136
<i>Figure 45 : Profil d'expression de la lignée NP689.</i>	137
<i>Figure 46 : Le blocage de la neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 pendant le rappel induit un défaut de MLT.</i>	138
<i>Figure 47 : La MLT est normale lorsque les neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 ne sont pas bloqués pendant le test.</i>	139
<i>Figure 48 : Le blocage de la neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 pendant le rappel induit un défaut de MRA.</i>	140
<i>Figure 49 : La neurotransmission des neurones MB-V3/V4 est requise pendant l'apprentissage.</i>	141
<i>Figure 50 : La neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 n'est pas requise pour le rappel de la mémoire à 2h.</i>	142
<i>Figure 51 : La neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 n'est pas requise pendant l'apprentissage,</i>	143

Introduction

1 Généralités

1.1 La mémoire

Depuis plus d'un siècle, l'un des plus grands défis des neurosciences est la compréhension des mécanismes de formation et de restitution de la mémoire. Le processus de mémorisation se décompose en trois étapes : l'apprentissage, le stockage/consolidation et le rappel. L'apprentissage se définit comme l'acquisition d'une information qui peut se manifester par un changement de comportement en fonction de son expérience. La perdurance de ce changement comportemental dans le temps est le révélateur de la formation d'une mémoire, incluant la phase de consolidation et la phase de rappel. Pour un animal dans son milieu naturel, la mémoire peut avoir différentes fonctions, telles que : retrouver une source de nourriture, fuir une zone de prédation, retrouver son lieu d'habitation... La plupart des questions sous-jacentes à la formation de la mémoire concernent la nature, la durée, la localisation et les mécanismes des changements intervenant dans le système nerveux. Ces changements sont également nommés traces mnésiques.

L'un des tous premiers neurobiologistes à s'intéresser à ces mécanismes fut Ivan Pavlov (1849-1936). Ayant remarqué que les chiens avaient tendance à saliver avant d'entrer réellement en contact avec les aliments, il décida d'investiguer plus en détail cette « sécrétion psychique ». C'est ainsi qu'il découvrit les lois fondamentales de l'acquisition et la perte des réflexes conditionnels (qui deviendraient plus tard les réponses conditionnées) c'est-à-dire, les réponses réflexes, comme la salivation, qui ne se produisent que de façon conditionnelle dans des conditions expérimentales spécifiques chez l'animal. Il développa ainsi le concept de conditionnement classique, qui s'intéresse aux conséquences d'un apprentissage lié à l'association entre des stimuli de l'environnement et les réactions automatiques de l'organisme. Cette notion de réaction non volontaire est le principal point qui le différencie du conditionnement opérant, où l'apprentissage conduit à un changement de comportement volontaire.

Le principe du conditionnement classique a été adapté à de maintes reprises afin d'étudier plus en détail les mécanismes sous-jacents à la formation de ces réflexes conditionnés. Ainsi, l'étude des réflexes défensifs de l'aplysie, un mollusque gastéropode, en réponse à des stimuli tactiles a permis des avancées majeures. La stimulation tactile des branchies et du siphon situés sur le dos de cet

organisme provoque un réflexe de retrait. L'application répétée de ce stimulus et son association avec un autre stimulus provoquent des réactions d'habituation (diminution graduelle de l'intensité ou de la fréquence d'apparition du réflexe conditionné) et de sensibilisation (augmentation graduelle de l'intensité ou de la fréquence d'apparition du réflexe conditionné lorsqu'il est associé à un stimulus désagréable) (Carew et al., 1983; Kandel and Tauc, 1965; Pinsker et al., 1970). Les résultats obtenus sur l'aplysie par E. Kandel (prix nobel de physiologie et médecine, 2000) ont permis de déterminer que l'apprentissage repose sur des changements fonctionnels d'efficacité de connections excitatrices déjà existantes (Byrne and Kandel, 1996; Kandel and Schwartz, 1982). Ces travaux ont également révélé l'importance de la voie de la 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Cedar et al., 1972) et de la protéine kinase A (PKA) dans la formation des mémoires à court terme (sensibilisation) (Castellucci et al., 1980) et du facteur de transcription CREB (cAMP –response element binding protein) dans la formation de la mémoire à long terme (Dash et al., 1990). Ainsi, il été proposé que la formation de la mémoire à court terme repose sur des changements d'efficacité synaptique alors que la mémoire à long-terme induit des changements dans le nombre de ces synapses.

L'étude de l'apprentissage et de la mémoire a également bénéficié de l'apport d'un autre neurobiologiste, Seymour Benzer (1921-2007). Celui-ci s'est tout d'abord intéressé à la biologie moléculaire, notamment à la structure et à la régulation des gènes et a développé un système basé sur la recombinaison permettant l'étude systématique de mutations (Benzer, 1955, 1962). Celui-ci s'est ensuite tourné vers les neurosciences, et plus particulièrement vers les mécanismes neurogénétiques du comportement chez la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*. Fort de son expérience en biologie moléculaire, Benzer a développé l'approche « bottom-up » (de bas en haut) pour l'étude des mécanismes neurobiologiques. Cette approche repose sur le principe qu'une mutation ponctuelle d'un gène donné a des conséquences importantes au niveau de la physiologie et du comportement de l'animal. Ainsi, l'étude d'une mutation précise permet de comprendre des mécanismes moléculaires puis cellulaires impliqués dans un mécanisme aussi complexe que l'apprentissage (Benzer, 1967). Benzer a été l'un des premiers à réaliser que la compréhension des mécanismes génétiques du comportement chez la drosophile aiderait à comprendre le fonctionnement de cerveaux plus complexes. Le laboratoire de S. Benzer a mis au point de nombreux paradigmes permettant l'étude du comportement chez la drosophile (Quinn et al., 1974). Ceux-ci ont permis d'identifier un certain nombre de « gènes du comportement » tels que *period* (Konopka and Benzer, 1971), le premier mutant de rythme circadien identifié, ou *amnesiac (amn)* (Quinn et al., 1979) et *dunce (dnc)* (Dudai et al., 1976), tous deux impliqués dans l'apprentissage

olfactif. Près de 40 ans après l'identification des premiers mutants, le rôle physiologique des gènes affectés est encore loin d'être totalement élucidé, et ce malgré des avancées considérables.

1.2 Intérêt de la drosophile

Drosophila melanogaster est un organisme modèle pour l'étude de nombreux mécanismes développementaux et cellulaires ; son cycle de reproduction court (10 jours à 25°C) et la possibilité d'obtenir un grand nombre d'individus en un temps restreint facilitant l'étude des mécanismes génétiques. Bien que son cerveau ne contienne que 100.000 neurones (Ito et al., 2003), la drosophile est néanmoins capable de comportements complexes, tels que la parade nuptiale, la synchronisation de ses cycles jour/nuit (rythmes circadiens), et bien évidemment la mémoire. Son système nerveux est composé de cellules gliales et de neurones dont le fonctionnement est très proche de celui des mammifères. Par ailleurs, une grande majorité des neurotransmetteurs, impliqués dans la communication entre les neurones sont identiques et près de 50% des gènes humains comptent un candidat orthologue chez la drosophile (Rubin et al., 2000). Ainsi, les mécanismes génétiques et moléculaires de formation de la mémoire identifiés chez la drosophile peuvent potentiellement être généralisés à d'autres espèces, et notamment les mammifères.

Des décennies de recherche sur le développement et la génétique de la drosophile ont permis de développer de nombreux outils facilitant l'étude de la mémoire olfactive.

1.2.1 Premiers outils

Les premiers mutants de mémoire identifiés ont été générés par des mutagenèses à l'EMS (éthyl méthanesulfonate) qui produit des mutations aléatoires ponctuelles. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'affecter un gène de manière spécifique, contrairement aux délétions qui recouvrent de larges zones du génome, et ainsi de corrélérer de manière précise une mutation à un phénotype donné. Les mutants *dnc* (Dudai et al., 1976), *amnesiac* (Quinn et al., 1979) et *rutabaga* (*rut*) (Livingstone et al., 1984) présentant des défauts de mémoire olfactive ont été générés par une mutagenèse à l'EMS. Néanmoins, ces mutations ne sont pas traçables et il est souvent difficile d'identifier le gène affecté par cette mutation. Ainsi, il a fallu attendre de nombreuses années afin que les gènes impliqués dans ces défauts de mémoire soient identifiés et leur fonction moléculaire caractérisée. La fonction moléculaire de *dnc* a été caractérisée 5 ans plus tard, grâce à deux cribles réalisés en parallèle afin d'identifier des mutants de mémoire olfactive et des mutants de la voie AMPc (Byers et al., 1981). Ce n'est que 10 ans plus tard que la fonction phosphodiesterase de *dnc* sera déterminée (Chen et al., 1986). Le mutant *amn* a été caractérisé en 1995 car il supprimait le

phénotype de stérilité observé dans les mutants *dnc* (Feany and Quinn, 1995). Le rôle précis de ces différents gènes sera détaillé plus loin (introduction, 2.3.1 et 2.4.1)

1.2.2 Le système Gal4/UAS

Il est également possible de générer des mutants à l'aide de transposons. Ces fragments d'ADN de plusieurs milliers de bases peuvent être mobilisés et insérés de manière aléatoire dans le génome. Dans certains cas, un élément-P va s'insérer dans un gène, affectant l'expression de celui-ci ; il est alors exprimé selon le profil d'expression du gène dans lequel il est inséré. Ces éléments transposables possèdent plusieurs marqueurs génétiques facilitant l'identification de leur point d'insertion. Ainsi, plusieurs mutants de mémoire ont été identifiés grâce à cette technique d'« enhancer-trap », en cherchant des éléments-P présentant une expression préférentielle dans une structure d'intérêt. C'est le cas par exemple de mutants tels *linotte (lio)* (Dura et al., 1993), *latheo (lat)* (Boynton and Tully, 1992) ou *leonardo (leo)* (Skoulakis and Davis, 1996).

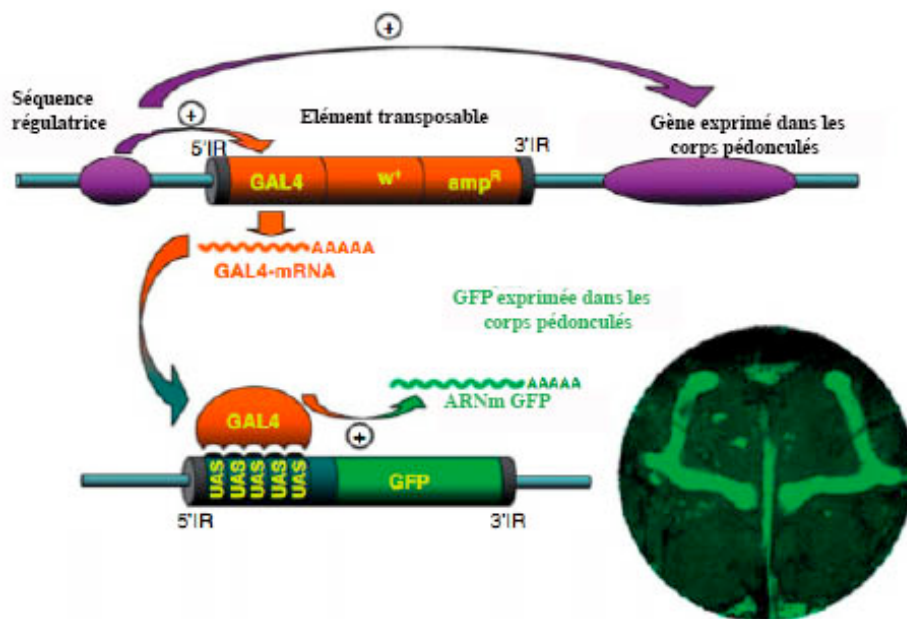


Figure 1: Le système Gal4/UAS.

Lorsqu'un élément transposable « enhancer-trap » est inséré près de séquences régulatrices contrôlant l'expression dans un gène donné, le gène Gal4 contenu dans l'élément-P est exprimé dans la même structure. Si la mouche contient également un gène rapporteur en aval de la séquence UAS, GAL4 va activer la transcription du rapporteur. GFP : green fluorescent protein, ARNm : acide ribonucléique messager.

Ces éléments transposables permettent également de contrôler spatialement l'expression d'un transgène. Ils peuvent en effet contenir une séquence codant la protéine Gal4, un facteur de

transcription. Ce Gal4 peut se fixer spécifiquement sur des séquences UAS (pour upstream activating sequence, séquence activatrice en amont d'un gène), permettant la transcription de gènes en aval de cette séquence dans un ensemble de cellules bien défini (**Fig. 1**). De nombreux gènes peuvent être placés en aval de cette séquence UAS, permettant l'expression d'un rapporteur (par exemple une protéine fluorescente telle que GFP), d'une toxine etc.

1.2.3 Contrôle spatio-temporel de l'expression d'un gène

Plusieurs améliorations ont pu être apportées à ce système GAL4/UAS, notamment afin de contrôler la dynamique de l'expression d'un gène et de s'affranchir d'éventuels défauts de développement. À l'aide d'un transgène supplémentaire, GAL80^{ts}, on peut en effet contrôler l'expression d'un gène par la température (McGuire et al., 2003). En effet, à température restrictive (< 30°C), la protéine GAL80^{ts} se fixe à la protéine GAL4 et inhibe son activité transcriptionnelle. À température permissive (> 30°C), la protéine GAL80^{ts} change de conformation et n'est plus capable d'inhiber le GAL4 qui peut donc librement activer la transcription des gènes en aval d'un UAS. (**Fig. 2B**)

Le système Gene-Switch permet quant à lui de contrôler l'expression d'un gène cible à l'aide d'une drogue (Mao et al., 2004). Dans ce cas, la protéine GAL4 nécessite la présence d'une molécule, le RU486, pour jouer son rôle de facteur de transcription (**Fig. 2A**).

Ces deux systèmes s'avèrent ainsi de puissants outils, permettant une régulation aussi bien spatiale que temporelle de l'expression d'un gène.

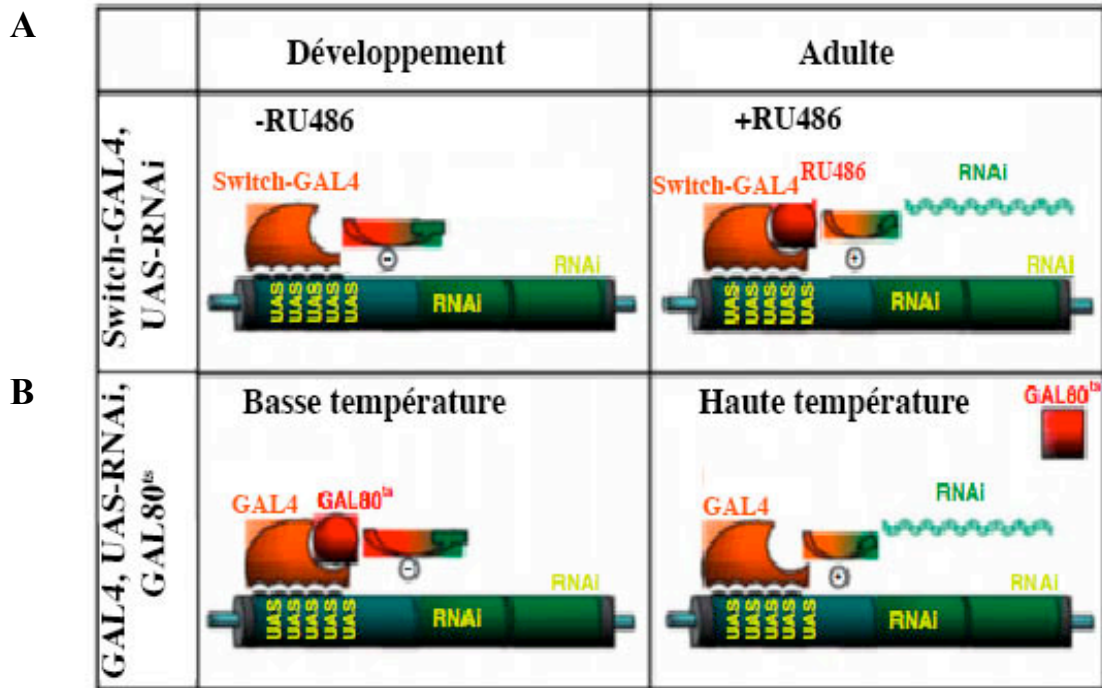


Figure 2 : Les systèmes GAL80^{ts} et Switch-GAL4/UAS permettent de séparer les effets développementaux des effets physiologiques chez l'adulte.

Une séquence codant un ARNi (ARN interférent) est placée sous contrôle d'une séquence UAS. A) Avec le système Gene-switch, en absence de RU486, le facteur de transcription GAL4 est inactif. Lorsque la drogue est ajoutée au milieu de culture, elle se fixe sur la protéine GAL4 et active la transcription de l'ARNi. B) A basse température (20°C), la protéine GAL80^{ts} se fixe sur le GAL4, inhibant son activité transcriptionnelle. Lorsque les mouches sont adultes, elles sont transférées à haute température (30°C) ; la protéine GAL80^{ts} devient inactive et le GAL4 peut activer la transcription des gènes en aval de la séquence UAS (Isabel, 2008).

1.2.4 Contrôle de l'expression d'un gène par ARN interférence

Une autre technique permet de cibler plus spécifiquement un gène d'intérêt. Chez la plupart des espèces, il existe un complexe protéique (RISC) qui permet de dégrader les ARN double brin, considérés comme un signe d'infection virale (Novina and Sharp, 2004). Ainsi, l'injection d'ARN double brin réprime spécifiquement l'expression du gène ciblé par cet ARN (Hammond et al., 2001) (**Fig. 3**). Chez la drosophile, il est possible d'insérer un transgène codant pour un ARN double brin afin d'obtenir des lignées stables (Kennerdell and Carthew, 2000). Le couplage de ce transgène avec le système inductible Switch s'avère être un formidable outil, permettant d'inhiber l'expression d'un gène donné à un moment et à un endroit précis.

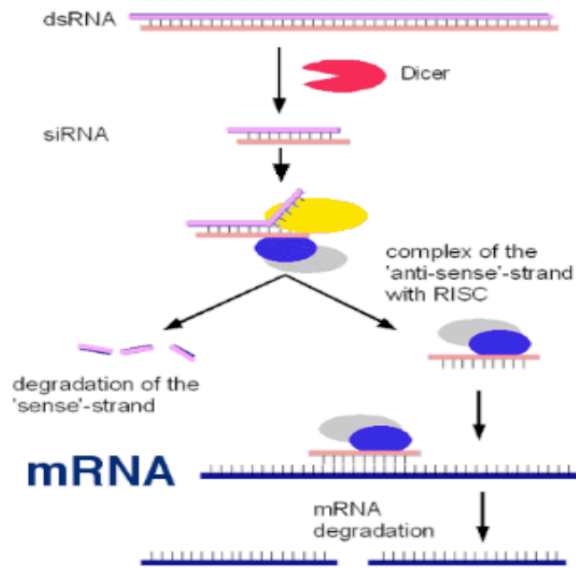


Figure 3 : Mécanisme de l'ARN interférence.

Lorsqu'un ARN double brin (dsRNA) est présent dans la cellule, il est découpé en petits fragments d'ARN interférents (siRNA) de 21 à 25 nucléotides par l'enzyme Dicer. Le brin sens est dégradé et le brin anti-sens est pris en charge par le complexe RISC. Le complexe RISC + siRNA se fixe alors sur l'ARNm cible et induit sa dégradation.

1.2.5 Contrôle localisé de l'activité neuronale

Plusieurs transgènes permettant un contrôle de l'activité des neurones ont été développés chez la drosophile. Par exemple, la toxine tétanique TNT, permet de bloquer la transmission synaptique en clivant la protéine Synaptobrevine, impliquée dans la libération des vésicules synaptiques. Ainsi, l'expression de cette toxine médiée par un pilote d'expression GAL4 permet un blocage spécifique de la neurotransmission dans certains neurones (Sweeney et al., 1995). Néanmoins, cette toxine est exprimée de manière irréversible et tout au long de la vie de l'individu et les résultats observés lors de l'utilisation de ce transgène peuvent donc être dus à des problèmes développementaux.

Un autre transgène a ainsi été développé afin de s'affranchir d'éventuels problèmes de développement. Le gène *shibire* (*shi*) code pour une dynamine impliquée dans l'endocytose et essentielle pour le recyclage des vésicules synaptiques. Un allèle thermo-sensible de ce gène, *shi^{ts1}* a été développé (Kitamoto, 2001). Cet allèle est dominant et bloque le recyclage des vésicules synaptiques à température restrictive (>29°C), entraînant un blocage rapide et réversible de la transmission synaptique (**Fig. 4**). L'utilisation d'un transgène UAS-Shi^{ts} couplé à un pilote d'expression GAL4 permet donc un contrôle spatio-temporel précis de l'activité de certains neurones.

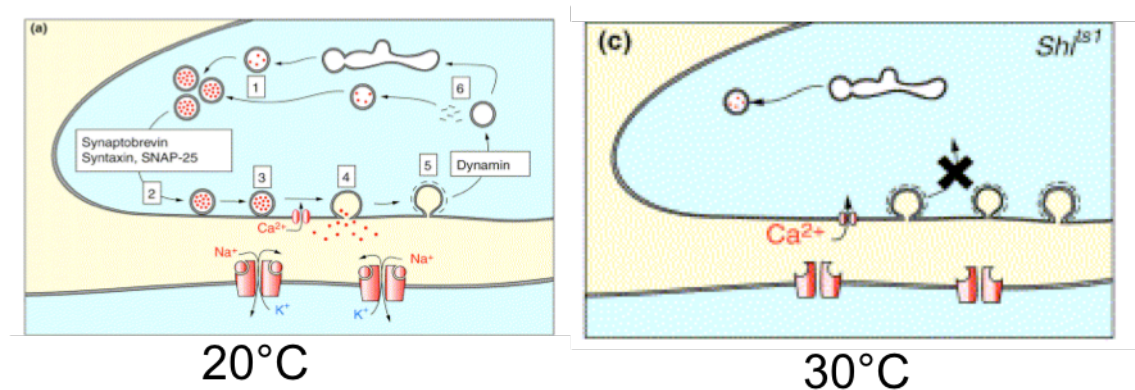


Figure 4 : L'expression de la protéine thermosensible Shi^{ts} permet de contrôler l'activité des neurones.

A température permissive (20°C), la protéine Shi^{ts} est fonctionnelle et la neurotransmission se fait normalement. A température restrictive (> 29°C), le dominant négatif Shi^{ts} empêche le recyclage des vésicules synaptiques et induit un blocage de la transmission synaptique des neurones.

Depuis quelque temps, d'autres transgènes permettant d'augmenter l'activité des neurones au lieu de la réprimer ont été développés. La Channelrhodopsine 2 (ChR2) code pour un canal transmembranaire sensible à la lumière. Ainsi, l'application d'un stimulus lumineux sur les neurones exprimant ChR2 entraîne une dépolarisation et une activation de celui-ci (Boyden et al., 2005; Nagel et al., 2005). Enfin, la protéine codée par UAS-dTrp permet une activation de neurones à température permissive (> 30°C) (Parisky et al., 2008; Shang et al., 2008).

1.2.6 Imagerie *in vivo*

L'un des inconvénients majeurs dans l'étude du fonctionnement du cerveau de la drosophile est que les corps cellulaires des neurones sont de petite taille (moins de 5 µm). Il est ainsi difficile de réaliser des études électrophysiologiques afin de déterminer l'ordre et les niveaux d'activation des neurones au cours du temps. Néanmoins, des mesures indirectes de l'activité neuronale sont possibles à l'aide de sondes ratiométriques (**Fig. 5**). Plusieurs ont été mises au point, permettant de visualiser des changements de la concentration intracellulaire en calcium, UAS-GCaMP (Nakai et al., 2001), UAS-TN-XL (Mank et al., 2006), UAS-cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999; Nakai et al., 2001), des variations de pH indiquant une libération de neurotransmetteurs, UAS-SpH (Miesenbock et al., 1998), voire directement l'activité phosphorylatrice d'une protéine comme la pKa avec UAS-AKAR (Zhang et al., 2001).

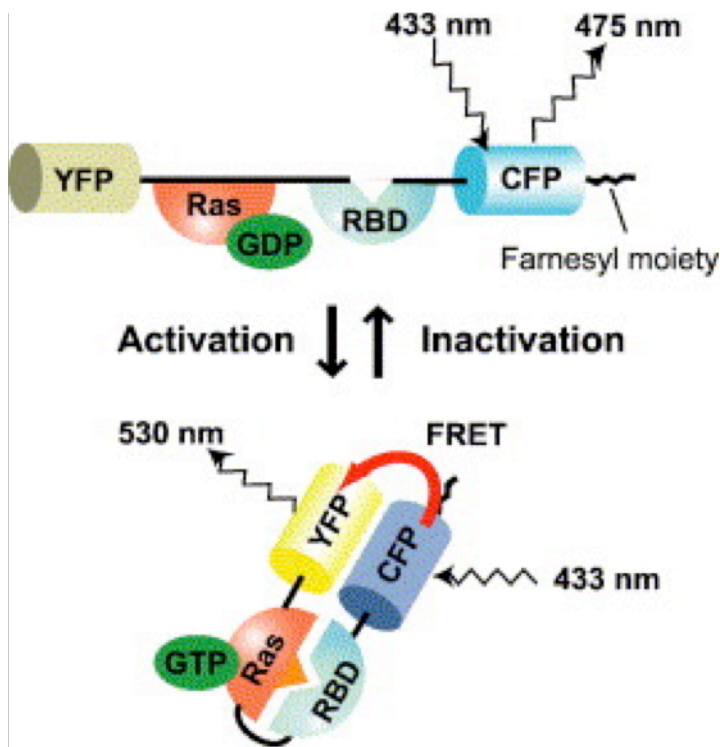


Figure 5 : Exemple de sondes FRET ratiométriques pour les Rho GTPases (Raichu-RhoA)

La sonde FRET comprend un domaine de liaison à Ras (RBD) et Ras entre deux formes dérivées de GFP (YFP et CFP). Lorsque le domaine Ras fixe une molécule de GTP, il se fixe à RBD et la sonde change de conformation, permettant un signal FRET

(Nakamura et al., 2006)

1.3 La mémoire chez la Drosophile

Plusieurs paradigmes expérimentaux permettant l'étude de la mémoire ont été développés chez la drosophile, notamment : pour la mémoire visuelle (Wolf and Heisenberg, 1990), les mémoires olfactives appétitive (Tempel et al., 1983) et aversive (Quinn et al., 1974), la mémoire aversive à la chaleur (Wustmann et al., 1996) ou la mémoire de la parade nuptiale (Siegel and Hall, 1979; Tompkins et al., 1983). Au laboratoire nous utilisons principalement le protocole de mémoire aversive et depuis peu de temps, un protocole permettant l'étude de la mémoire appétitive à long terme a également été mis au point (Colomb et al., 2009; Krashes and Waddell, 2008).

1.3.1 Protocole expérimental

Le premier paradigme expérimental permettant l'étude de la mémoire olfactive aversive a été développé dans le laboratoire de Seymour Benzer dans les années 70 (Dudai, 1977b; Quinn et al., 1974; Tully and Quinn, 1985) puis amélioré progressivement (Pascual and Preat, 2001 ; Tully et al., 1994; Tully and Quinn, 1985). Pendant l'apprentissage, des chocs électriques (US pour unconditioned stimulus) sont associés à une odeur (l'odeur appariée, CS+ pour conditioned stimulus) ; puis une seconde odeur (l'odeur non appariée, CS-) est présentée sans choc électrique.

Afin de tester leur mémoire, les mouches sont placées dans un appareil en T à un point de convergence où elles doivent choisir entre les deux odeurs pendant une minute (**Fig. 6**). La répartition des mouches dans chaque compartiment reflète les capacités mnésiques des mouches ; les mouches évitant majoritairement l'odeur précédemment associée au choc lorsqu'elles ont appris.

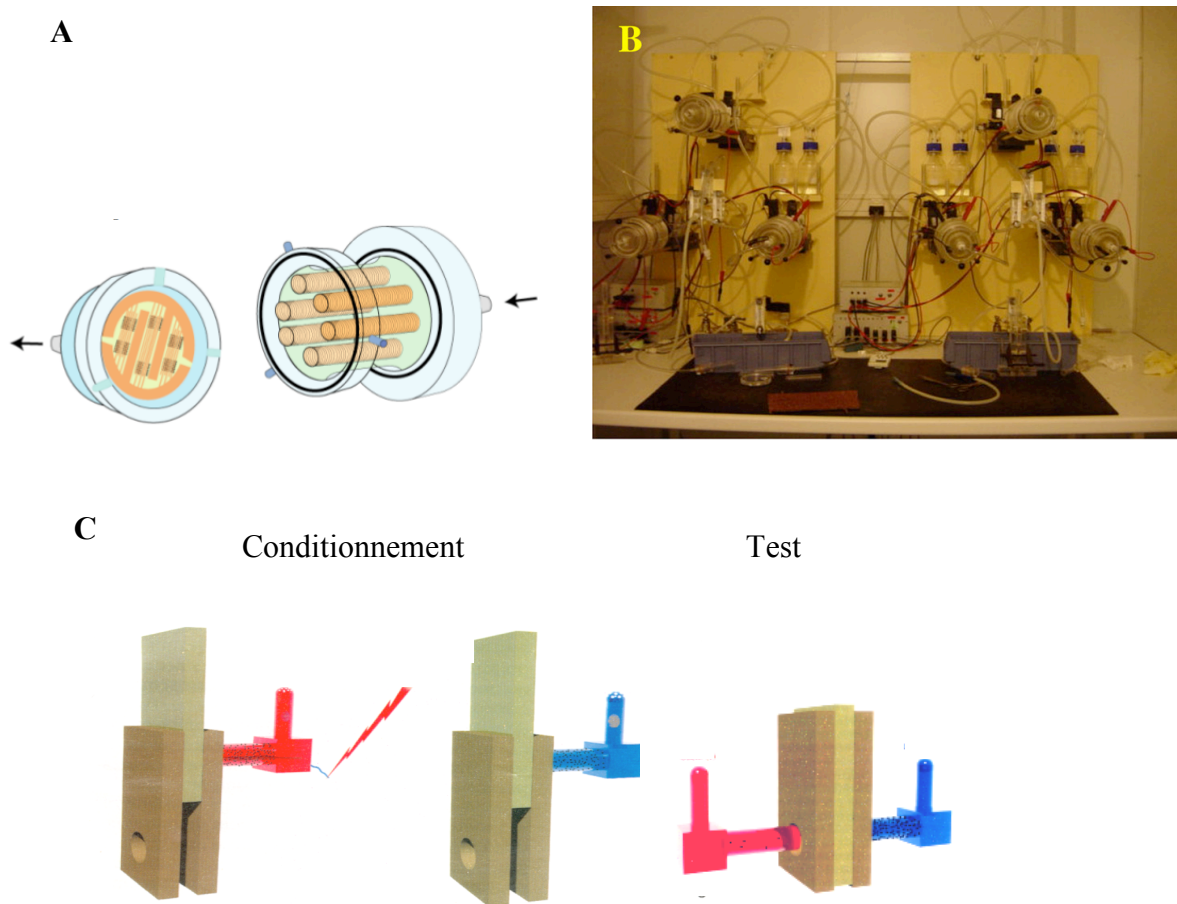


Figure 6 : Paradigme expérimental du conditionnement olfactif aversif.

- A. Barillet utilisé pour le conditionnement. Chaque barillet est constitué de 6 chambres recouvertes de grilles électrisables permettant de conditionner des groupes d'une trentaine de mouches. Le trajet des odeurs est matérialisé par les flèches.
- B. Pièce de comportement. 6 barillets peuvent être utilisés simultanément permettant de conditionner 36 groupes de mouches à la fois. Les flux d'air et d'odeurs sont contrôlés par des électrovannes en amont des barillets et des générateurs contrôlent l'administration des chocs électriques. L'ensemble est piloté par un ordinateur situé à l'extérieur de la pièce
- C. Principe du conditionnement aversif mis au point par Seymour Benzer. Dans un premier temps, l'odeur 1 (rouge) est présentée aux mouches en présence de chocs électriques. Puis l'odeur 2 (bleue) est présentée sans choc électrique. Pendant le test, les mouches sont placées à un point de convergence dans la machine en T où elles doivent choisir entre les deux odeurs. Les mouches sauvages ayant une bonne mémoire choisissent préférentiellement l'odeur 2, non associée au chocs électriques.

1.3.2 Intérêt du conditionnement associatif aversif

Le conditionnement Pavlovien est un processus par lequel un individu va associer une réponse déjà « programmée » (ou inconditionnelle, par exemple la fuite), qui est normalement déclenchée par un stimulus inconditionnel (ex : la présence de chocs électriques), à un stimulus conditionné, c'est-à-dire à un stimulus neutre qui normalement ne déclenche aucune réponse (ex : l'odeur CS+). Ce conditionnement est de type pavlovien puisqu'il repose sur l'association de deux stimuli, l'odeur CS+ prédisant l'arrivée de chocs électriques. Néanmoins, dans le cadre du conditionnement olfactif aversif, la réponse n'est pas totalement inconditionnelle puisque l'animal peut choisir ou non de fuir, contrairement au chien de Pavlov qui ne peut pas s'empêcher de saliver. Après apprentissage, le CS+ pourrait soit devenir une représentation du stimulus inconditionnel, soit être relié à la réponse inconditionnelle.

On peut se questionner sur la pertinence du conditionnement aversif avec choc électrique, les mouches ne rencontrant vraisemblablement pas ce stimulus conditionné en milieu naturel. Le conditionnement appétitif avec du sucre serait donc plus pertinent d'un point de vue éthologique. Néanmoins, l'intérêt d'un stimulus comme le choc électrique est qu'il ne dépend d'aucune autre condition et qu'il est subit de manière identique chez toutes les mouches, contrairement au sucre qui sera perçu différemment en fonction de la satiété et de la motivation de l'individu. Par ailleurs, il est facile de changer l'intensité du stimulus inconditionnel, par exemple en faisant varier l'intensité, la fréquence ou la durée des chocs électriques.

Enfin, un autre avantage du protocole de mémoire aversive utilisé au laboratoire est qu'il permet de travailler sur un grand nombre de mouches, contrairement aux protocoles étudiant la mémoire de la parade nuptiale ou de simulateur de vol pour la mémoire visuelle. Ainsi, d'un point de vue statistique, les indices de performance moyens calculés après le test reflètent mieux la valeur réelle des performances mnésiques d'un génotype donné.

1.3.3 Différents types de conditionnement induisent la formation de différents types de mémoire

1.3.3.1 Protocole court

Un cycle de conditionnement (protocole court) suffit à induire la formation d'une mémoire olfactive chez la drosophile. Néanmoins, celle-ci est de courte durée puisque la performance des mouches chute assez rapidement au cours du temps. Un jour après conditionnement, la mémoire de ces mouches est quasi-nulle alors qu'elle est maximale juste après conditionnement (85%). La

mémoire formée après le protocole court diminue lorsque les mouches sont soumises à un choc par le froid (à 4°C) peu après le conditionnement mais devient progressivement plus résistante lorsque ce choc est administré plus tardivement (Quinn and Dudai, 1976; Tully et al., 1994). Ainsi, deux phases de mémoire différentes sont formées après un conditionnement avec le protocole court : une mémoire labile sensible à l'anesthésie (MSA) qui comprend la mémoire à court terme (MCT) qui dure quelques minutes, puis la mémoire à moyen terme (MMT) qui dure plusieurs heures; et une mémoire résistante à l'anesthésie (MRA), semi-consolidée, qui se forme progressivement dans l'heure suivant le conditionnement et décroît plus lentement que les MCT et MMT (**Fig. 7**).

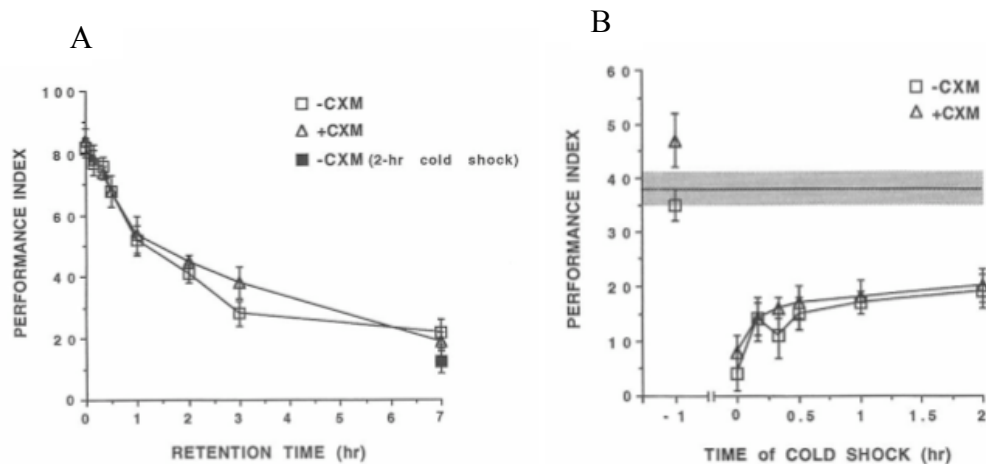


Figure 7 : La mémoire formée après un cycle de conditionnement est composée d'une mémoire sensible à l'anesthésie et d'une mémoire résistante à l'anesthésie.

- A. La mémoire formée décroît rapidement après un cycle de conditionnement et ne dépend pas de la synthèse protéique (carré blanc : sans inhibiteur de synthèse protéique CXM, triangle blanc : avec CXM). Lorsque les mouches sont anesthésiées par le froid 2 heures après conditionnement, la mémoire mesurée à 7 heures n'est pas affectée (carré noir).
- B. La mémoire à 3 heures est mesurée après un cycle de conditionnement. La mémoire est diminuée lorsqu'un choc par le froid est appliqué immédiatement après apprentissage mais devient de plus en plus résistante quand l'anesthésie est administrée plus tardivement. Ces résultats montrent la consolidation d'une MRA, qui devient maximale après 2 heures (asymptote). L'inhibiteur de synthèse protéique CXM n'a pas d'effet sur la consolidation de la MRA. L'administration d'un choc par le froid une heure avant conditionnement n'a pas d'effet sur la mémoire à 3 heures, indiquant qu'il n'y a pas d'effet non spécifique du traitement.

1.3.3.2 Protocole massé

Le protocole massé consiste en la succession de 5 cycles de conditionnement sans intervalle de repos. Il induit également la formation de MSA et d'une MRA plus élevée qu'avec le protocole court (**Fig. 8**). Ainsi les mouches conditionnées à l'aide de ce protocole ont une mémoire à un jour relativement importante (Tully et al., 1994)(Chabaud et al., 2009, sous presse)

1.3.3.3 Protocole long

Il consiste en la succession de 5 cycles de conditionnement espacés d'une période de repos de 15 min. Ce protocole induit la formation de la mémoire à long terme (MLT), une mémoire consolidée, résistante à l'anesthésie, et stable pendant près d'une semaine (Tully et al., 1994). Elle dépend de la synthèse protéique *de novo* puisque l'administration d'un inhibiteur de synthèse protéique (la cycloheximide, ou CXM) avant le conditionnement fait chuter cette mémoire de près de 50% contrairement aux MSA (Dudai, 1977a) et MRA (Tully et al., 1994) (**Fig. 8**).

La présence de MRA après un conditionnement long fait l'objet de débats dans le domaine (cf. introduction 3.3)

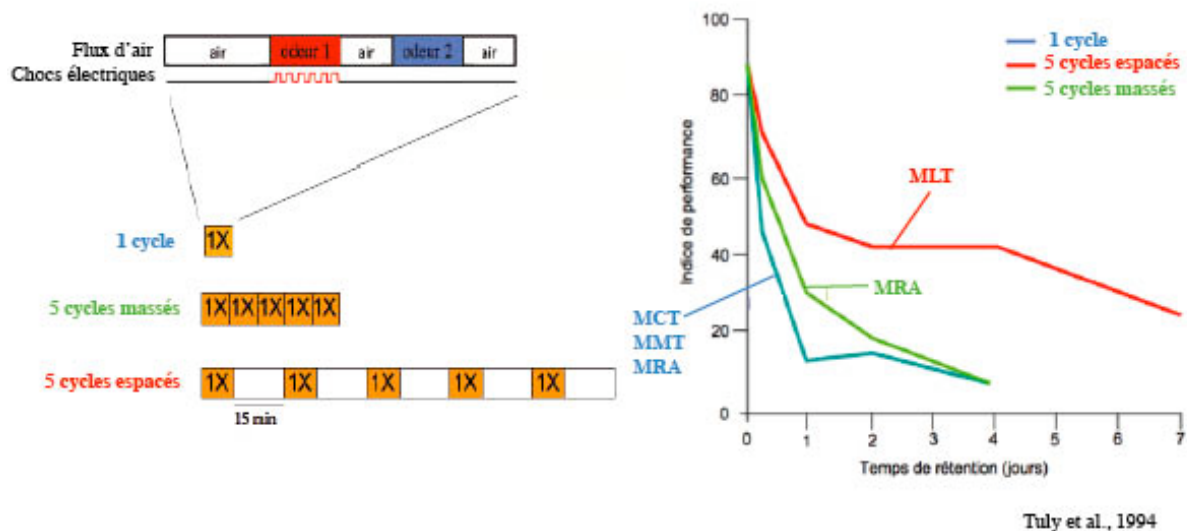


Figure 8 : Différents protocoles induisent différents types de mémoire.

Les différents protocoles sont indiqués dans la partie gauche du graphique. Les courbes de rétention mnésique sont indiquées dans le graphique avec des couleurs correspondant au protocole.

1.4 Anatomie morphologique et fonctionnelle

1.4.1 Présentation générale du système nerveux central

Le système nerveux central de la drosophile se divise en deux parties : la chaîne nerveuse ventrale thoracique et abdominale, reliée au système nerveux périphérique, et le cerveau, constitué d'à peu près 100.000 neurones (Ito et al., 2003). Chez les Insectes, les neurones sont unipolaires.

Les corps cellulaires sont massés en périphérie du cerveau alors que les projections dendritiques et axonales sont au centre formant le neuropile. Ainsi, les synapses se forment uniquement au niveau des projections et non pas en amont du corps cellulaire, contrairement à ce qui existe chez les Vertébrés.

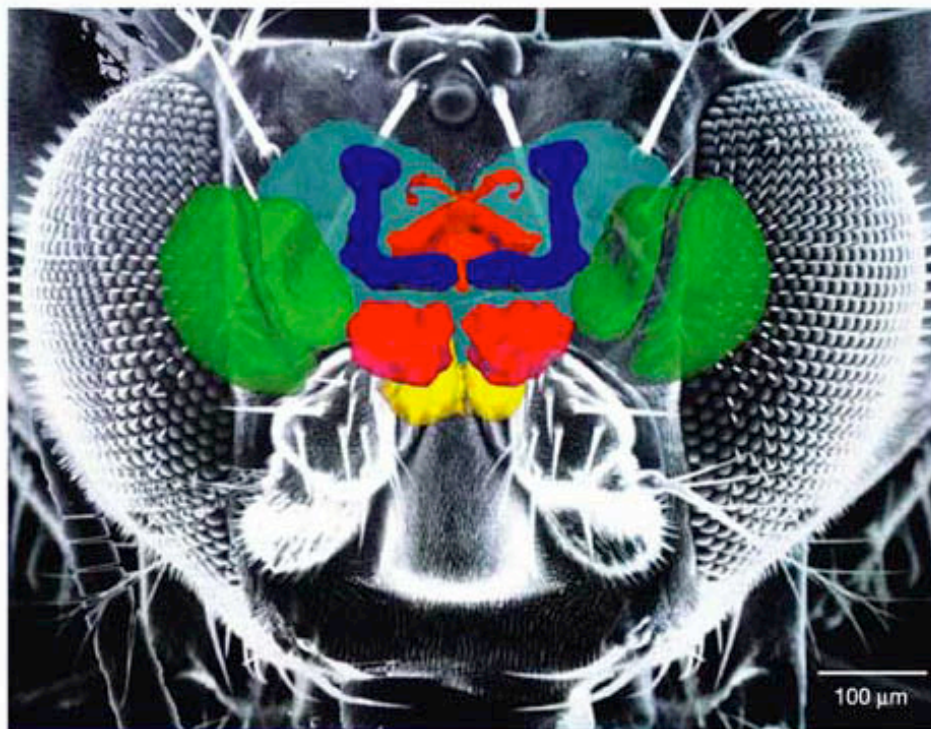
Le cerveau de la drosophile est traversé par le tube digestif de manière antéropostérieure, le divisant en ganglions supra- et sub-œsophagiens. Le ganglion supra-oesophagien est le plus volumineux et composé de trois neuromères : le tritocerebrum, le deutocerebrum et le protocerebrum.

1.4.2 Les corps pédonculés font partie du protocérébrum

C'est le neuromère le plus important par sa taille et sa complexité. Il est composé de quatre structures (**Fig. 9**) :

- les lobes optiques, impliqués dans le traitement de l'information visuelle
- la *pars intercerebralis*, composée de neurones sécréteurs, qui projettent sur les *copora cardiaca* et les *corpora allata* (l'équivalent fonctionnel du système hypothalamo-hypophysaire des vertébrés)
- le complexe central, composé de 20.000 neurones et qui regroupe quatre structures : le pont protocérébral, le corps en éventail, les nodules et le corps en ellipse. De par sa position centrale dans le cerveau de la drosophile, le complexe central reçoit des afférences d'une grande partie du cerveau. Il joue un rôle important dans l'activité locomotrice de la mouche. Il a été montré que le corps en éventail joue un rôle important dans la formation de la mémoire visuelle (Liu et al., 2006) et que le corps en ellipse est important pour le rappel de la mémoire olfactive aversive (cf. introduction, 3.2.2) (Wu et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que le corps assymétrique, une structure située ventralement par rapport au corps en éventail joue un rôle dans la formation de la MLT (Pascual et al., 2004).

les corps pédonculés (CPs) jouent un rôle important pour un grand nombre de fonctions complexes, telles que la parade (Mehren et al., 2004), la généralisation du contexte visuel (Liu et al., 1999), le sommeil (Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006) et la mémoire olfactive (Heisenberg et al., 1985). Ils reçoivent des afférences des neurones de projection, et sont considérés comme un centre olfactif de 2nd ordre, notamment pour la réponse aux odeurs attractives (Wang et al., 2003). Les corps pédonculés jouent également un rôle dans le contrôle du comportement locomoteur de la drosophile (Martin et al., 1998).



Heisenberg, 2003

Figure 9 : Représentation schématique du cerveau de drosophile.

En vert, les lobes optiques ; en jaune, les ganglions sous-oesophagiens, en rouge, les lobes antennaires ; en bleu, les corps pédonculés ; en orange, le complexe central ; en turquoise, le reste du neuropile entourant les corps pédonculés et le complexe central.

Les CPs sont une structure propre au cerveau central des insectes et leur organisation est particulièrement bien conservée chez les Arthropodes (Strausfeld et al., 1998). Le rôle des CPs dans la formation de la mémoire olfactive a d'abord été démontré chez l'abeille (Erber, 1980; Menzel, 1974) puis chez la drosophile (de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg et al., 1985).

Les CPs sont une structure bilatérale formée de deux sous structures symétriques. Ils sont séparés du reste du neuropile par une fine couche de cellules gliales. Chaque CP est composé d'environ 2.500 neurones, dits neurones intrinsèques ou cellules de Kenyon. Les corps cellulaires des cellules de Kenyon sont regroupés en périphérie, dans la partie dorsale et postérieure de chaque hémisphère (Ito et al., 1997). Ils projettent leurs dendrites antéro-ventralement dans une région de forme glomérulaire appelée les calices. Ces projections sont post-synaptiques et reçoivent des afférences des lobes antennaires via le tractus antenno-cérébelleux médian (mACT) (**Fig. 10**).

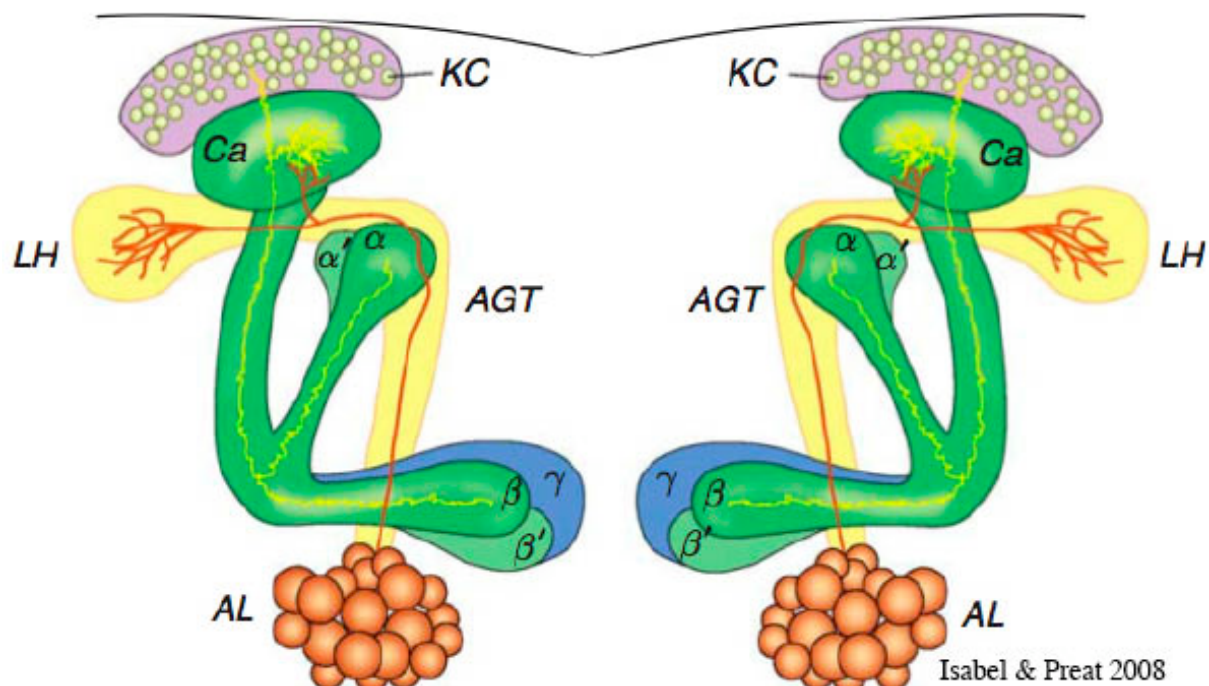


Figure 10 : Représentation schématique des lobes antennaires et des corps pédonculés.

Chaque corps pédonculé est composé de 2500 neurones, les cellules de Kenyon (KC). Trois types de KC projettent leur axone dans cinq lobes différents : α/α' , β/β' et γ . Les neurones de projection partent des lobes antennaires (AL) en formant le tractus antenno-glomérulaire (AGT) et projettent au niveau de la corne latérale (LH) et des épines dendritiques des Kc, les calices (Ca)

Les CPs sont constitués de trois grand types de neurones, appelées cellules de Kenyon : les neurones α/β , les neurones α'/β' et les neurones γ . Par ailleurs, il a été montré que le cœur des CPs formé par une partie des lobes α/β , présentait une immunoréactivité différente par rapport à la zone périphérique (Strausfeld et al., 2003), suggérant que la diversité cellulaire des cellules de Kenyon soit plus importante que ce qui a été caractérisé jusqu'à présent.

Les axones des cellules de Kenyon se projettent sous forme fasciculée en formant le pédoncule. Ce faisceau se projette antéro-ventralement jusqu'à la marge antérieure du neuropile. Dans la partie antérieure, les axones défasciculent et se divisent en différents lobes : trois lobes médians (β , β' et γ) et deux lobes verticaux (α et α'). Certains axones projettent dans une structure plus latérale appelée le talon (Crittenden et al., 1998; Ito et al., 1997). Certaines cellules de Kenyon donnent naissance à une projection verticale et médiale. Ainsi les axones des lobes α et β proviennent des mêmes neurones ainsi que les axones des lobes α' et β' . Chez la larve, les axones γ projettent aussi

bien médialement que dorsalement mais la branche verticale, qui sert de matrice pour la croissance des axones α et α' , disparaît au début de la métamorphose, ne laissant que la branche médiale et le talon des lobes γ (Lee et al., 1999).

De nombreux neurones extrinsèques aux CPs ont été décrits (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008). Comme nous le verrons plus loin, certains neurones extrinsèques, comme les neurones dopaminergiques ou les DPM, ont déjà été caractérisés aussi bien d'un point de vue anatomique que fonctionnel, mais la fonction d'une grande majorité de ces neurones n'a pas été identifiée à ce jour.

1.4.3 Le deutocérébrum

Il est composé principalement des lobes antennaires (LA). Les neurones olfactifs, situés dans les antennes et les palpes maxillaires projettent leur axone au niveau des lobes antennaires, composés d'une cinquantaine de glomérules. Des lobes antennaires partent les neurones de projection, regroupés sous formes de tractus et projetant soit directement sur la corne latérale, soit indirectement en innervant les terminaisons dendritiques des corps pédonculés (**Fig. 9 et 10**).

1.4.4 Le tritocérébrum

Il est composé de deux lobes relativement petits et bilatéraux à la base du cerveau. Ceux-ci jouxtent le ganglion sous-oesophagien. Les deux lobes sont reliés par un faisceau de fibres nerveuses appelées une "commissure". La fonction principale du tritocérébrum serait de contrôler les interactions entre le proboscis et le tube digestif, notamment via les nerfs stomatogastriques. Par ailleurs, il reçoit des informations sensorielles des soirs via le nerf tégumental.

2 La formation des mémoires à court terme

2.1 Intégration des informations olfactives

Afin de comprendre comment une mémoire olfactive peut être stockée dans le cerveau, il est indispensable de comprendre comment les odeurs sont encodées dans le système olfactif.

2.1.1 Détection des molécules odorantes

En premier lieu, les mouches sentent les odeurs grâce à leurs 1.400 neurones olfactifs localisés dans les antennes et les palpes maxillaires. A la surface de ces neurones sont présents des récepteurs olfactifs, protéines transmembranaires couplées aux protéines G et similaires aux récepteurs métabotropiques des neurotransmetteurs. Chaque neurone olfactif exprime l'un des 61 récepteurs olfactifs présents chez la drosophile et également OR83b, un co-récepteur requis pour l'expression du récepteur olfactif au niveau de l'épithélium sensoriel (Elmore et al., 2003; Larsson et al., 2004). Dans de rares cas, les neurones olfactifs peuvent exprimer plusieurs récepteurs olfactifs (Goldman et al., 2005).

2.1.2 Les lobes antennaires sont le centre olfactif primaire

Les neurones olfactifs exprimant le même récepteur olfactif projettent au niveau du même glomérule, parmi la cinquantaine de glomérules présents dans chaque LA (Gao et al., 2000; Vosshall et al., 2000). A l'intérieur de chaque glomérule, les neurones olfactifs cholinergiques synapsent avec plusieurs types de neurones : les neurones de projection, cholinergiques et excitateurs ; et des inter-neurones locaux, soit inhibiteurs (GABAergiques), soit excitateurs (cholinergiques) (Jefferis et al., 2001; Marin et al., 2002; Stocker et al., 1997). Les drosophiles adultes ont à peu près 150 neurones de projection, ce qui suggère que de chaque glomérule partent entre 3 à 5 neurones (Stocker et al., 1997). Les dendrites de ces neurones projettent en général sur un unique glomérule. Ainsi chaque neurone de projection reçoit des informations d'un type unique de neurone olfactif et donc d'un seul type de récepteur olfactif (Ito et al., 1998; Stocker, 1994) (**Fig. 11 et 12**).

Peu de temps après l'association d'un choc électrique à une odeur, la présentation de l'odeur induit une réponse dans un plus grand nombre de glomérules, suggérant que la plasticité des LA pourrait jouer un rôle dans la formation de la mémoire immédiate (Yu et al., 2004). Néanmoins, il n'existe à ce jour aucune preuve fonctionnelle du rôle des lobes antennaires dans la formation de la mémoire olfactive aversive, contrairement à la mémoire appétitive chez la drosophile (Thum et al., 2007) et chez l'abeille (Erber, 1980).

2.1.3 Les corps pédonculés et le protocérébrum latéral sont les centres olfactifs secondaires

Les neurones de projection forment deux tractus à la sortie des LA : le tractus antenno-cérébelleux interne (iACT) et médial (mACT) (Ito et al., 1998; Stocker et al., 1997). Les neurones de projection formant l'iACT synapsent d'abord sur les calices des CPs puis sur la corne latérale

alors que ceux du mACT, issus des glomérules ventraux, projettent directement au niveau de la corne latérale (Stocker et al., 1997) (**Fig. 11 et 12**). Quelques neurones de projection du mACT sont inhibiteurs et reçoivent des afférences de nombreux glomérules. Ainsi, ils pourraient être activés par plusieurs, voire toutes les odeurs (Jefferis et al., 2007).

Les neurones de projection partant d'un même glomérule ont des projections similaires au niveau de la corne latérale, suggérant que les connections sont également stéréotypées à ce niveau (Jefferis et al., 2007; Marin et al., 2002; Wong et al., 2002). Les terminaisons synaptiques des neurones de projection coïncident avec des neurones intrinsèques de la corne latérale arborisant dans le protocérébrum latéral (Tanaka et al., 2004). Les neurones formant l'iACT projettent sur l'ensemble de la corne latérale alors que ceux qui forment le mACT projettent uniquement dans la zone ventrale. Par ailleurs, une spécificité fonctionnelle a été révélée au niveau de la corne latérale, la zone ventrale répondant plus fortement aux phéromones et la zone dorsale répondant plus fortement aux odeurs de fruit (Jefferis et al., 2007).

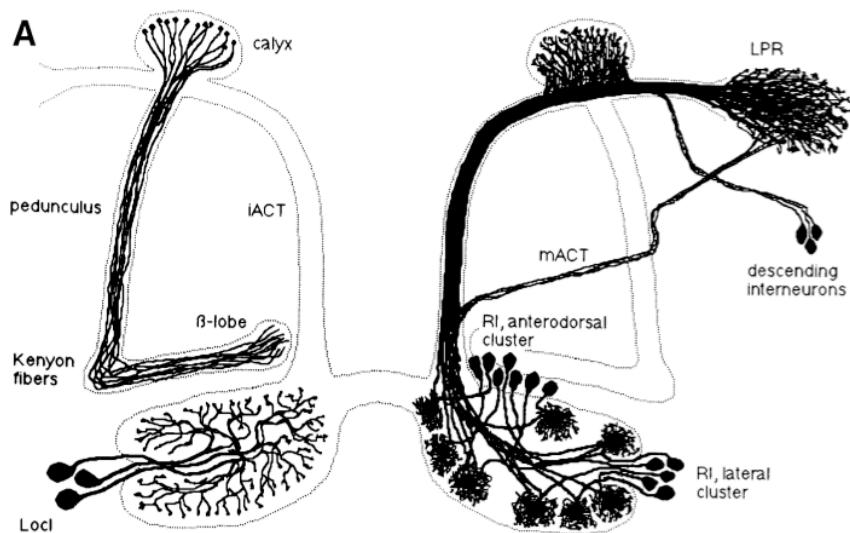


Figure 11 : Représentation schématique des neurones de projection.

Les corps cellulaires des neurones de projection (RI pour interneurons de relais) sont regroupés en un cluster antéro-dorsal et un cluster latéral. Les axones sont regroupés en deux faisceaux qui projettent soit directement sur la corne latérale en formant le mACT (LPR pour protocérébrum latéral) soit indirectement via les calices des corps pédonclés en formant le iACT (calyx). Les corps cellulaires des interneurons locaux sont situés latéralement aux LA (Stocker et al., 1997).

Pourquoi les neurones de projection projettent à la fois sur les CPs et la corne latérale ? Si l'on bloque les neurones de projection à l'aide de la toxine tétanique TNT, la réponse aux odeurs aversives et attractives des mouches naïves est perturbée (Heimbeck et al., 2001). Par ailleurs, il a été démontré que les mouches sans CPs présentent une réponse aux odeurs aversives normale (de Belle and Heisenberg, 1994) et que le blocage de la transmission synaptique des CPs perturbe la

réponse attractive des mouches aux odeurs appétitives (Wang et al., 2003). Ces différents résultats suggèrent donc des rôles différents pour ces deux centres olfactifs de 2nd ordre : le LH serait impliqué dans la réponse aux odeurs aversives et les CPs aux odeurs attractives. Ainsi, il a été proposé que la corne latérale serait une voie d'olfaction indépendante de l'expérience contrairement aux CPs (Heimbeck et al., 2001).

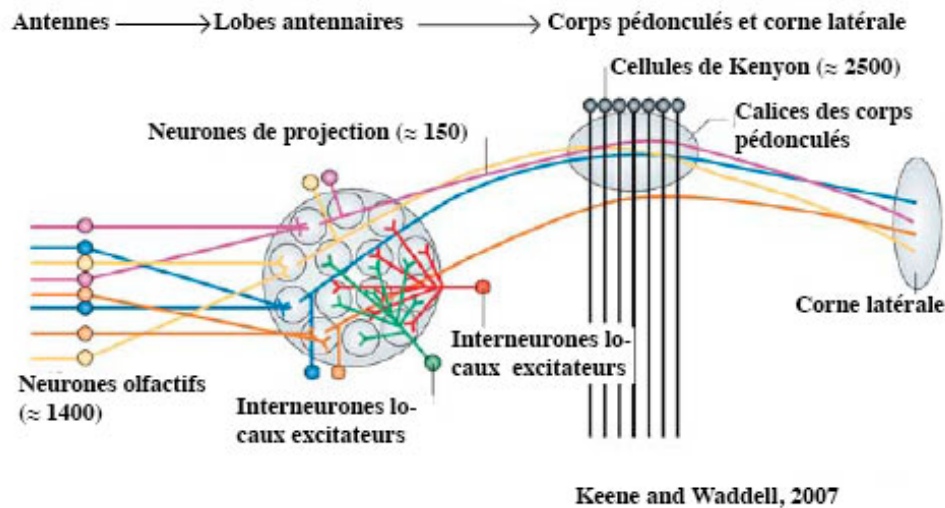


Figure 12 : Schéma du système olfactif de la drosophile.

Les neurones olfactifs exprimant le même récepteur (couleur identique) projettent leur axone dans le même glomérule dans les lobes antennaires. À cet endroit, ils synapsent avec trois classes de neurones : des neurones de projection uni-glomérulaires (même couleur que les neurones olfactifs pré-synaptiques directement reliés), des interneurons locaux multi-glomérulaires inhibiteurs (rouges) ou inhibiteurs (verts). Les neurones de projection forment des synapses avec les cellules de Kenyon au niveau des calices des corps pédonculés, avant de terminer dans la corne latérale. Certains neurones de projection (en orange) passent ventralement aux calices des corps pédonculés et projettent directement sur la corne latérale.

2.1.4 Traitement de l'information olfactive dans les corps pédonculés.

Les neurones de projection innervent des zones assez larges au niveau des calices des CPs sous formes de zones concentriques (Lin et al., 2007; Tanaka et al., 2004) (Fig. 11 et 12). Il semblerait par ailleurs que les terminaisons des neurones de projection innervent les calices de manière stéréotypique (Jefferis et al., 2007). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par imagerie calcique qui ont démontré que certaines odeurs activaient également des cellules de Kenyon de manière stéréotypée (Fiala et al., 2002; Wang et al., 2004)

Il semblerait en effet que le codage olfactif au niveau des CPs soit plutôt combinatoire et dynamique à la différence des LA. Néanmoins, des études d'imagerie *in vivo* des dendrites et des cellules de Kenyon à l'aide de sondes calcium indiquent que les odeurs activeraient effectivement

un nombre limité de cellules de Kenyon (Fiala et al., 2002; Wang et al., 2004). Au niveau des lobes des CPs, il semblerait cependant que la réponse aux odeurs soit plus diffuse que ne laisse présager l'activité restreinte au niveau des corps cellulaires (Yu et al., 2006).

2.2 Intégration du stimulus inconditionnel

Le protocole d'apprentissage olfactif le plus utilisé au laboratoire utilise un choc électrique comme stimulus non-conditionné (US). Récemment, un protocole d'apprentissage olfactif appétitif remplaçant le choc électrique par du sucre a été développé au laboratoire (Colomb et al., 2009) par amélioration de celui mis au point par Tempel et al. (1983).

L'ensemble des connaissances à l'heure actuelle suggère que les mécanismes impliqués dans la sensibilité à l'US feraient intervenir la voie monoaminergique, la dopamine dans le cadre d'un conditionnement aversif, l'octopamine pour l'appétitif.

2.2.1 Les neurones dopaminergiques sont requis pour l'apprentissage aversif

Les mécanismes impliqués dans la sensibilité aux chocs électriques ne sont pas connus. Cependant, plusieurs études ont permis de déterminer que le stimulus inconditionnel requiert la voie de la dopamine dans le cadre d'un conditionnement aversif.

La tyrosine hydroxylase (TH) est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la dopamine. Une fusion entre les séquences régulatrices du gène *TH* et de la séquence *gal4* permet d'exprimer des transgènes dans une grande partie des neurones dopaminergiques (Friggi-Grelin et al., 2003). En combinant le pilote d'expression TH-gal4 avec le transgène UAS- *shi^{ts}*, il a été montré que la signalisation des neurones dopaminergiques est nécessaire pendant l'acquisition d'une mémoire aversive mais pas appétitive (Schwaerzel et al., 2003).

Les neurones dopaminergiques projettent assez largement dans le cerveau de la drosophile et notamment sur les CPs (**Fig. 13-A**). Ainsi, il n'est pas évident que ce sont bien ces projections qui sont impliquées dans le renforcement négatif pendant le conditionnement. Une étude a résolu ce problème en regardant l'activité des neurones dopaminergiques grâce à la sonde calcium cameleon. Les neurones dopaminergiques qui projettent sur les CPs répondent fortement au choc électrique et faiblement aux odeurs (Riemensperger et al., 2005). Enfin, une étude de la mémoire olfactive chez la larve a confirmé le rôle des neurones dopaminergiques dans le renforcement négatif. Il a été démontré qu'en absence d'US, la stimulation par la lumière de neurones dopaminergiques

exprimant la Channelrhodopsine permet d'induire la formation d'une mémoire olfactive aversive (Schroll et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés chez l'adulte récemment en activant les neurones dopaminergiques pendant le conditionnement à l'aide de la protéine Trip (Parisky et al., 2008 ; Shang et al., 2008).

Deux récepteurs à la dopamine de type D1, couplés à l'adénylate cyclase, ont été identifiés chez la drosophile, dDA1 et DAMB ; et tous deux sont fortement exprimés dans les CPs (**Fig. 13-B et C**). Chez le mutant *dumb*, le gène codant le récepteur dDA1 est affecté. Les mouches *dumb* présentent des défauts d'apprentissage de mémoire olfactive aversive bien que la sensibilité au choc électrique et la réponse aux odeurs soient normales. Par ailleurs, l'expression d'un transgène *dDA1*⁺ dans les corps pédonculés de mouches adultes permet de sauver le défaut d'apprentissage observé en contexte *dumb* (Kim et al., 2007). Un rôle de DAMB dans la formation de la mémoire olfactive n'a pas encore été démontré à ce jour.

Ces différents résultats démontrent que l'activité des neurones dopaminergiques est suffisante pour apporter l'information choc électrique jusqu'aux CPs via le récepteur dDA1.

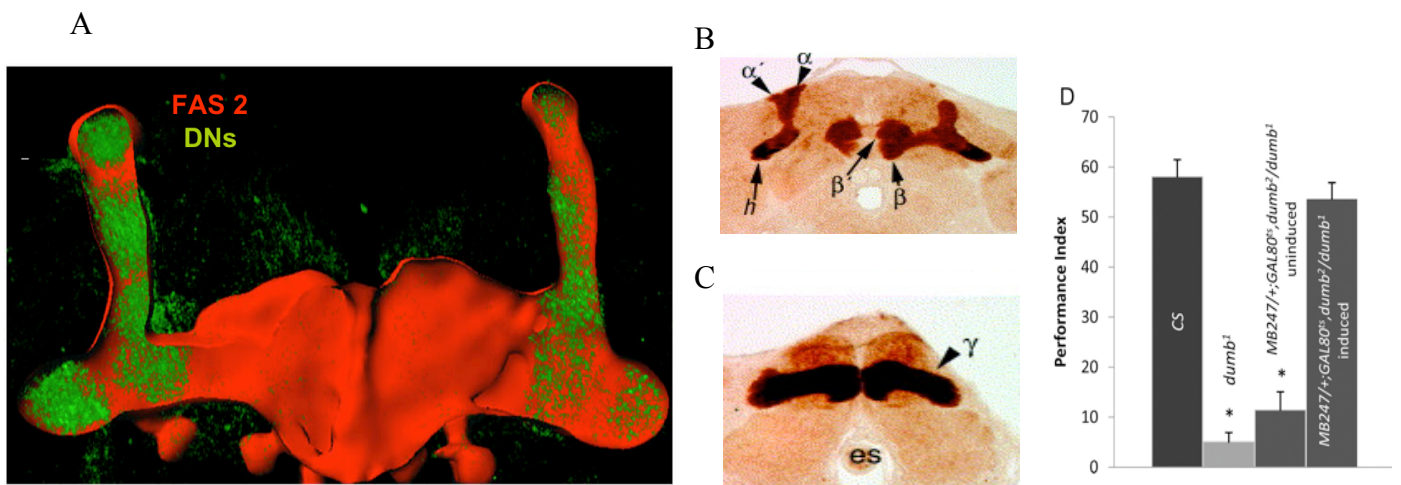


Figure 13 : Les neurones dopaminergiques sont impliqués dans la voie du choc électrique pour la mémoire aversive.

(A) Reconstruction tri-dimensionnelle des zones de projection des neurones dopaminergiques au niveau des lobes des corps pédonculés. La protéine CD8-GFP est exprimée dans les neurones dopaminergiques par le pilote d'expression TH-GAL4 (vert). Les CPs sont visualisés par un anticorps anti-Fas II (rouge) (Birman et al.). (B-C) : Expression du récepteur dDA1 dans les lobes des corps pédonculés. dDA1 est exprimé majoritairement dans les corps pédonculés, aussi bien dans les lobes α/α' , β/β' (B) que dans les lobes γ (C). (D) Le mutant *dumb*¹ affectant le gène *dDA1* présente un défaut d'apprentissage. La sur-expression de *dDA1* (*dumb*²) dans les corps pédonculés par le pilote d'expression MB247 sauve le défaut d'apprentissage observé dans un contexte *dumb*¹. Aucun sauvetage n'est observé lorsque les mouches sont élevées à température restrictive (uninduced) (Kim et al., 2003).

2.2.2 Les neurones octopaminergiques sont requis pour l'apprentissage appétitif

La tyramine β -hydroxylase codée par le gène *Tbh* est impliquée dans la voie biochimique de synthèse de l'octopamine. Les drosophiles mutantes pour ce gène ont un défaut spécifique de mémoire appétitive qui est sauvé lorsque les mouches sont nourries avec de l'octopamine, excluant un défaut développemental (Schwaerzel et al., 2003). Chez l'abeille, les neurones octopaminergiques *VUMx₁* sont activés lors d'une présentation du sucre à l'animal et la stimulation électrique de ces neurones permet de remplacer la présentation du sucre lors d'un conditionnement appétitif (Hammer, 1993). Des neurones analogues ont été découverts chez la drosophile récemment (Sinakevitch and Strausfeld, 2006). Chez la larve, l'activation par la lumière de neurones *VUM-like* exprimant *ChR* permet également de remplacer la présentation du sucre (Schroll et al., 2006). Ainsi, les neurones octopaminergiques jouent le rôle de renforçateur positif lors de la formation de la mémoire appétitive .

2.3 Intégration de l'odeur et des chocs électriques dans les corps pédonculés

Les CPs sont le centre de la mémoire olfactive chez la drosophile et le lieu d'intégration des deux informations odeur et chocs. Le rôle des CPs dans la formation de la mémoire olfactive a d'abord été démontré chez l'abeille (Erber, 1980; Menzel, 1974). Il a ensuite été démontré que les CPs jouent un rôle dans la formation de la mémoire olfactive chez la drosophile à l'aide de mutants anatomiques (Heisenberg et al., 1985) mais les défauts anatomiques étaient nombreux chez ces mutants. Une approche pharmacologique a permis de confirmer ce résultat. En effet, si des larves sont nourries avec de l'hydroxyurée, un inhibiteur de la division cellulaire, au stade où seuls les neuroblastes précurseurs des futurs CPs sont actifs, les adultes n'ont plus de CPs. Ces mouches sans CPs n'ont plus de mémoire olfactive bien que les sens impliqués dans la formation de cette mémoire soient intacts (olfaction, sensibilité aux chocs électriques, locomotion)(de Belle and Heisenberg, 1994). Le rôle fondamental des CPs dans la mémoire olfactive est également corroboré par le fait qu'un grand nombre de gènes impliqués dans la formation de la mémoire olfactive sont exprimés dans cette structure (Isabel, 2008; Keene and Waddell, 2007; McGuire et al., 2005).

2.3.1 Mécanismes moléculaires de formation de la mémoire à court terme

2.3.1.1 *dunce (dnc)*

Les premiers mutants de mémoire olfactive ont été identifiés dans les années 1970 par l'équipe de Seymour Benzer (Dudai et al., 1976; Quinn et al., 1974). Des approches biochimiques ont permis de montrer que le mutant de mémoire olfactive *dnc* a une activité phosphodiesterase réduite, entraînant une augmentation de la concentration intra-cellulaire en 3'-5' monophosphate (AMPc) (Byers et al., 1981; Davis and Kiger, 1981). Le gène *dnc* est exprimé préférentiellement dans les CPs (Nighorn et al., 1991) (**Fig. 14**). Ces résultats ont démontré pour la première fois chez la drosophile qu'une concentration trop importante d'AMPc dans les CPs entraîne un défaut de mémoire olfactive.

2.3.1.2 *rutabaga (rut)*

Le mutant *rutabaga (rut)*, également identifié dans le laboratoire de S. Benzer présente également des défauts d'apprentissage associatif. L'activation de l'adénylate cyclase Rut est activée par la calmoduline en présence de calcium et par des protéines G, augmente la concentration intra-cellulaire en AMPc. Elle est exprimée principalement dans les cellules de Kenyon (Han et al., 1992). Elle pourrait jouer le rôle de détecteur de coïncidence entre l'odeur et le choc électrique en étant activée spécifiquement dans un nombre limité de cellules de Kenyon par des vagues de Ca^{2+} qui suivent la dépolarisation des neurones de projection et la fixation de monoamines sur les récepteurs couplés aux protéines G (**Fig. 14**).

L'expression d'un transgène *rut*⁺ dans les CPs permet de sauver le phénotype de perte de mémoire olfactive présent dans les mouches mutantes pour *rut* (Zars et al., 2000). Cette première étude a permis de confirmer le rôle de *rut* dans la formation de la mémoire olfactive. Néanmoins, le transgène était exprimé tout au long du développement et il n'était pas possible de savoir si le défaut de mémoire observé dans les mutants *rut* provenait d'un défaut de développement du cerveau ou bien du réel manque de la cyclase chez l'adulte. Deux études ont permis de déterminer à l'aide des systèmes GAL80^{ts} et Gene-Switch, que l'expression de la protéine Rut uniquement chez l'adulte permet la formation d'une mémoire olfactive sauvage (Mao et al., 2004; McGuire et al., 2003). Les expériences de sauvetage de *rut* dans les différents neurones des CPs sera abordée plus loin (cf. introduction, 2.3.2).

Les mutants amorphes pour *rut* sont encore capables de produire une mémoire olfactive, même amoindrie. Ceci suggère qu'une deuxième cyclase pourrait jouer un rôle pendant l'apprentissage, ou qu'il existerait une autre voie d'apprentissage, indépendante de l'AMPC.

Chez les mutants *rut*, une trop faible concentration d'AMPC dans les CPs chez l'adulte induit un défaut de mémoire olfactive. Les gènes *rut* et *dnc* ayant des effets opposés sur la production d'AMPC, on pourrait s'attendre à ce qu'un double mutant pour ces deux gènes ait une mémoire meilleure que celle de chaque mutant individuellement. Cependant, les doubles mutants *rut*, *dnc* ont une mémoire très faible (Tully and Quinn, 1985), suggérant que la concentration d'AMPC doit être contrôlée finement au cours du temps, ou que les gènes *rut* et *dnc* sont exprimés dans des réseaux neuronaux différents.

2.3.1.3 $G\alpha_s$

La protéine $G\alpha_s$ est une sous-unité des protéines G qui activent des effecteurs intra-cellulaires en réponse à la fixation de ligands sur des récepteurs membranaires. Une protéine $G\alpha_s$ constitutivement active ($G\alpha_s^*$) a été exprimée dans les CPs de la drosophile, avec pour conséquence une activation constitutive des adénylate cyclase et donc une concentration anormalement élevée en AMPC dans les cellules de Kenyon. Dans ce cas, les mouches ont une mémoire immédiate très faible, confirmant une fois de plus le rôle primordial de la concentration en AMPC pendant l'apprentissage (Connolly et al., 1996). De façon intéressante, les index de performance de ces mouches sont proches de 0, suggérant qu'il n'y aurait pas d'apprentissage indépendant de la voie AMPC chez la drosophile. Néanmoins, dans cette étude, l'expression de la protéine $G\alpha_s^*$ dans les CPs a lieu aussi bien pendant le stade larvaire que chez l'adulte. Ainsi, des défauts de développement dus à une activation constitutive de la voie AMPC ne peuvent pas être exclus.

2.3.1.4 *Neurofibromatosis de type I (Nf1)*

Il a été montré chez l'homme et chez la souris qu'une mutation du gène *Nf1* est responsable de la formation de tumeurs et de problèmes d'apprentissage (Ferner et al., 1996; Silva et al., 1997). L'homologue de ce gène est également requis chez des drosophiles adultes pendant l'apprentissage (Guo et al., 2000). La protéine NF1 est constituée de deux domaines : un domaine GRD (GAP-related domain) qui accélère l'inactivation de Ras (Ballester et al., 1990) ; et un domaine C-terminal requis pour l'activation d'adénylate cyclases dépendantes des protéines G, notamment RUT (Hannan et al., 2006). Récemment, il a été montré que le domaine GRD était requis pour la formation de la MLT alors que la partie C-terminale était requise pendant l'apprentissage (Ho et al.,

2007). Ces résultats démontrent encore une fois l'importance de la régulation de la voie de l'AMPc pendant l'apprentissage.

2.3.1.5 Protéine kinase A (PKA)

Ces différentes découvertes ont permis d'établir avec certitude l'importance de la voie de signalisation cellulaire de l'AMPc pendant l'apprentissage. L'un des composants principaux de la voie AMPc est la protéine kinase A. La PKA est une protéine tétramérique composée de deux sous-unités régulatrices et catalytiques. Lorsque la concentration d'AMPc augmente dans la cellule, de l'AMPc se fixe sur les deux sous-unités régulatrices qui relarguent les deux sous-unités catalytiques, leur permettant ainsi d'aller phosphoryler leurs cibles (**Fig. 14**). L'induction d'un inhibiteur de la protéine kinase (PKI) une heure avant le conditionnement induit un défaut de mémoire immédiate (Drain et al., 1991). Un crible de lignées exprimant GAL4 dans les CPs a permis d'identifier des allèles mutants du gène DCO codant pour la sous-unité catalytique de la PKA. Une réduction de 80% de l'expression de DCO entraîne un défaut sévère d'apprentissage chez des mutants (Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Des analyses de l'expression de l'ARN par hybridation in situ et de la protéine par immunohistochimie ont permis d'établir que DCO est exprimé préférentiellement dans les CPs. Enfin, une dernière étude s'est intéressée à la sous-unité régulatrice de type I (PKA-R1). Celle-ci a permis de déterminer que la PKA-R1 est exprimée dans les corps cellulaires des CPs et que les mutants présentent des défauts d'apprentissage (Goodwin et al., 1997).

Ainsi, ces différents résultats laissent penser que la PKA joue un rôle très précocement dans la formation de la mémoire olfactive. Néanmoins, l'activation de la PKA nécessite l'activation de plusieurs protéines et la production de molécules comme l'AMPc. Ainsi, il n'est pas évident que la PKA puisse être activée quelques secondes seulement après le conditionnement et les défauts d'apprentissage observés dans ces différentes études pourraient être liés à des défauts de développement. Une étude récente a montré qu'une chute de 50% de l'expression de DCO n'induisait pas de défaut d'apprentissage mais augmentait la MRA (Horiuchi et al., 2008) (cf. 3.1).

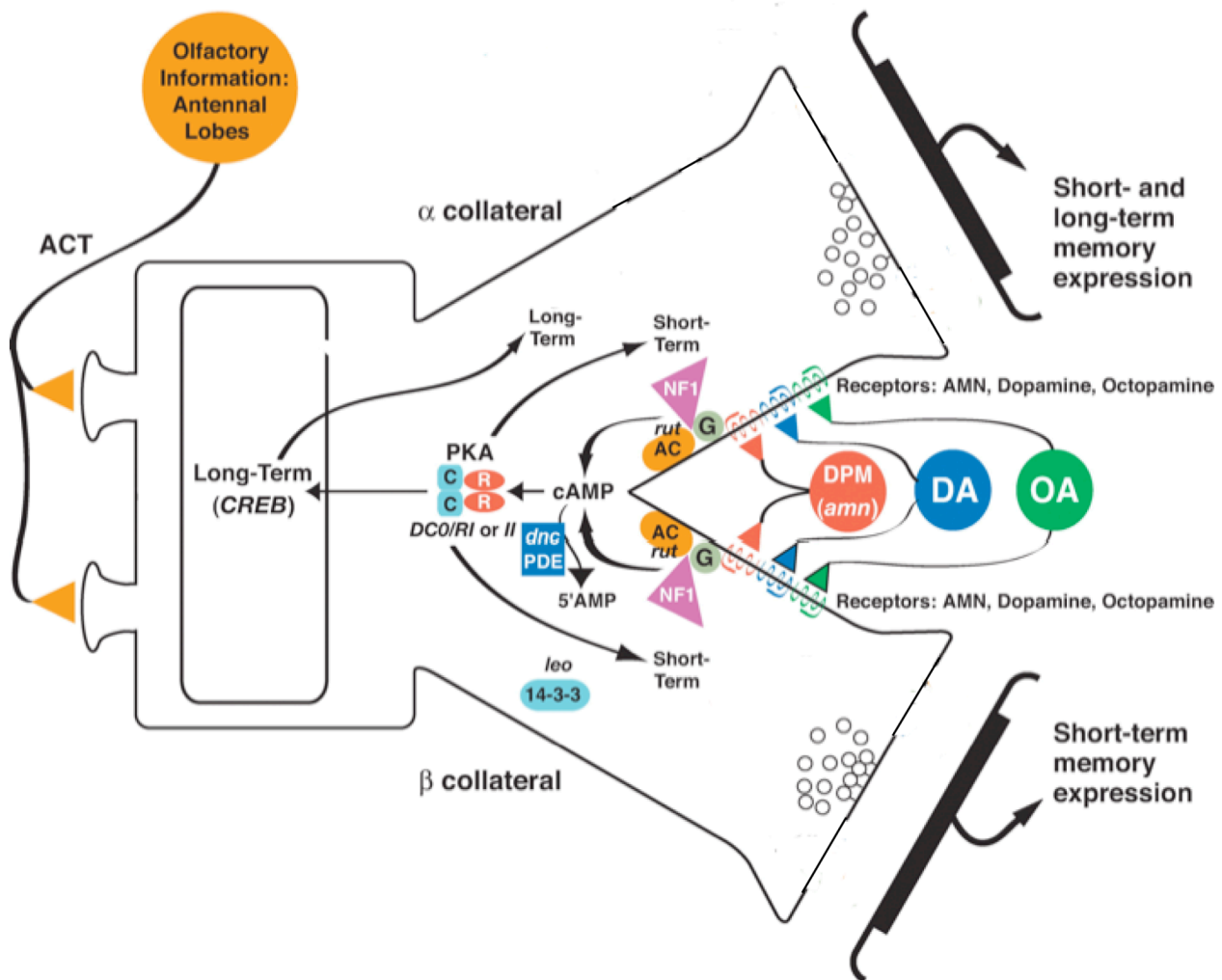
2.3.1.6 *G(o)*, un apprentissage indépendant de l'AMPc

La protéine hétérotrimérique *G(o)* est activée par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et participe à de nombreuses voies de signalisation cellulaire. La toxine pertussis produite par la plante *Bordetella pertussis*, empêche l'activation de la protéine *G(o)* par les GPCR, inhibant cette voie de signalisation. L'expression de cette toxine dans des CPs de mouches adultes entraîne un défaut de mémoire immédiate très important (Ferris et al., 2006). Le défaut de mémoire observé

est encore présent dans un contexte *rut*, suggérant que la voie d'apprentissage de G(o) serait indépendante de la voie AMPc. La fonction de cette protéine pendant l'apprentissage reste encore à déterminer mais elle pourrait inhiber les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant, restreignant ainsi la libération synaptique à certains neurones des CPs (Ikeda, 1996). Ces résultats montrent pour la première fois que les voies moléculaires impliquées dans l'apprentissage seraient plus nombreuses et plus complexes que ce que l'on a cru pendant longtemps.

2.3.1.7 *leonardo*

Le gène *leonardo* a été découvert au cours d'un crible de lignées GAL4, en se basant sur le profil d'expression préférentiel au niveau des corps pédonculés. Le gène affecté code une protéine appartenant à la famille 14-3-3. Les protéines 14-3-3 forment une famille ubiquitaire très conservée composée de 7 isoformes, sans activité enzymatique, formant des homodimères ou des hétérodimères. Une fois phosphorylées, les protéines 14-3-3 peuvent s'associer à de nombreuses protéines et réguler leur activité. Les mutants *leo* présentent un défaut d'apprentissage (Skoulakis and Davis, 1996), qui est sauvé lorsqu'un transgène *leo*⁺ est exprimé dans les CPs de mouches adultes. Ainsi, les gènes de la famille 14-3-3 joueraient un rôle physiologique dans l'apprentissage (Philip et al., 2001).



Davis, RL, 2005
 Annu. Rev. Neurosci. 28: 275–302

Figure 14 : Schéma de la voie AMPC/PKA dans les cellules de Kenyon

L'information olfactive est véhiculée par le tractus antenno-cerebelleux (ACT) jusqu'aux CPs. Le stimulus inconditionnel est véhiculé par les neurones dopaminergiques (DA) dans le cadre d'un conditionnement aversif, et par les neurones octopamniergiques (OA) dans le cadre d'un conditionnement appétitif. Dans ce modèle, les DA et OA activent l'adénylate cyclase (AC) Rut par des récepteurs couplés aux protéines G. Le produit du gène *Nfl* jouerait un rôle dans l'activation/régulation de l'AC. L'activation de l'AC produit une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. La phosphodiesterase codée par le gène *dunce* (*dnc*) dégrade l'AMPc. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices RI ou RII (R) de la PKA libère les sous-unités catalytiques (C) codées par le gène *DCO*. L'activation de la PKA conduit à la phosphorylation d'une grande variété de substrats permettant l'établissement de la MCT et à la phosphorylation de Creb pour la formation de la MLT. Les neurones DPM exprimant le gène *amnesiac* sont une voie d'entrée supplémentaire pour les CPs et sont requis pendant la consolidation. Ils pourraient activer la production d'AMPc dans les cellules de Kenyon par la sécrétion du neuropeptide Amn (cf. introduction, 2.4). Figure modifiée originale de (Davis, 2005).

2.3.2 Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire à court terme

Un grand nombre de résultats laissent à penser que les CPs sont effectivement le site majeur d'association de l'odeur et du choc électrique. Néanmoins, le fait qu'une mémoire soit perturbée par

l'ablation ou la perte fonctionnelle d'une structure ne signifie pas nécessairement qu'une trace mnésique est présente dans cette structure. Afin de localiser la MCT, il est donc nécessaire de sauver les performances mnésiques d'un mutant en exprimant une protéine d'intérêt dans une structure bien spécifique ou de visualiser directement la trace mnésique par imagerie *in vivo*.

2.3.2.1 Sauvetage de *rut* dans les CPs

Il a tout d'abord été montré que l'expression de la protéine Rut dans les neurones γ , mais pas dans les neurones α/β sauve partiellement le défaut de mémoire observé dans les mutants *rut* (Zars et al., 2000). En fait, une étude plus récente a déterminé que l'expression de Rut dans les neurones α/β sauvait faiblement le phénotype du mutant *rut* ; qu'un sauvetage intermédiaire est obtenu en l'exprimant dans les lobes γ ; et qu'un sauvetage total est obtenu en exprimant Rut dans les neurones α/β et γ (Akalal et al., 2006). Néanmoins, dans ces différentes études, Rut était exprimé tout au long du développement. Ainsi, le sauvetage du phénotype de perte de mémoire peut tout à fait être dû à la compensation de défauts de développement et non pas à un rôle direct de l'adénylate cyclase pendant l'apprentissage. A l'aide des systèmes Target et Gene-Switch, il a enfin été montré que la seule présence de Rut dans les neurones α/β et γ des CPs de mouches adultes était suffisante pour sauver le défaut de mémoire du mutant *rut* (Mao et al., 2004; McGuire et al., 2003).

2.3.2.2 Rôle des différents lobes

L'expression du transgène UAS-*shi*^{ts} dans les CPs a permis de montrer que la transmission synaptique des CPs est requise pendant la restitution de la mémoire olfactive mais pas pendant le conditionnement ni la consolidation (Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002). Mais plus particulièrement, quels neurones sont requis pour la restitution de la MCT ?

Deux études ont montré que la neurotransmission des neurones α , β et γ était requise (Dubnau et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002) alors qu'une autre n'impliquait que les neurones α et β (McGuire et al., 2001). A l'aide d'un pilote d'expression spécifique des neurones γ il a été montré dans notre laboratoire que ceux-ci sont effectivement requis pour la restitution de la mémoire à 2 heures (Isabel et al., 2004) (**Fig. 15**).

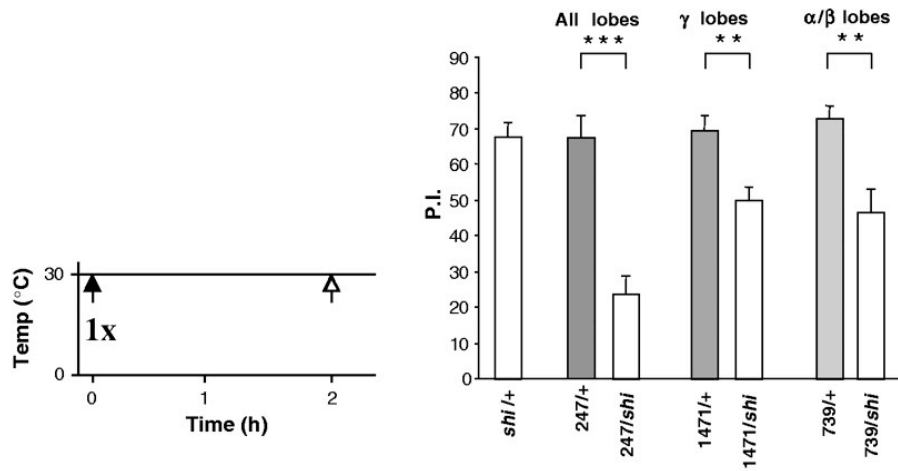


Figure 15 : Les neurones α/β et γ sont requis pendant le rappel des mémoires à court terme.

Le blocage des neurones γ (pilote d'expression 1471) et des neurones α/β (739) par *shi^{ts}* induit un défaut de mémoire à 2 heures. Le défaut de mémoire est plus important lorsque la neurotransmission des neurones α/β et γ est bloquée simultanément (Isabel et al., 2004).

Le mutant *ala* identifié au laboratoire présente des défauts de développement des CPs (**Fig.16**) : 36% des mutants *ala* n'ont pas de lobes médians β/β' , 4.5% n'ont pas de lobes verticaux α/α' , 10% n'ont pas de défaut et le reste présente des défauts différents dans les hémisphères gauche et droite (Pascual and Preat, 2001). Ainsi, il a été montré que les mutants *ala* sans lobes médians ou sans lobes verticaux ont une mémoire à 3 heures normale après un cycle de conditionnement (Isabel et al., 2004; Pascual and Preat, 2001). Ce résultat suggère donc que les différents lobes des CPs pourraient être redondants fonctionnellement.

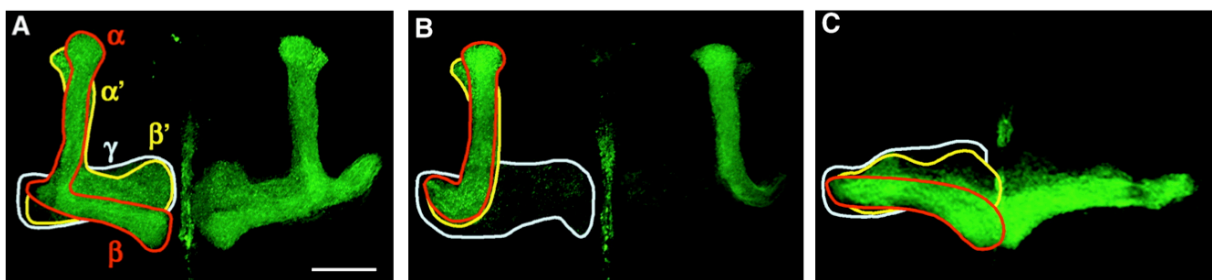


Figure 16: Les mutants *ala* présentent des défauts anatomiques des corps pédonculés.

Images de microscopie confocale des corps pédonculés de mouches sauvages (A) et de mutants *ala^{E13}* (B et C). L'expression de mCD8-GFP par le pilote d'expression OK107 permet de visualiser l'ensemble des CPs. Le lobe γ est délimité en blanc, les lobes α/α' en rouge et β/β' en jaune. A : les 5 lobes sont présents dans les mouches sauvages. B : 10% des mouches *ala^{E13}* n'ont pas de lobes médians β/β' . C : 4.5% des mutants *ala^{E13}* n'ont pas de lobes verticaux α/α' . Echelle : 40 μ m.

2.3.2.3 Les neurones α' et β' des corps pédonculés sont requis pendant l'apprentissage

Le blocage des neurones α'/β' pendant l'apprentissage ou une heure après apprentissage à l'aide de Shi^{ts} induit un défaut de mémoire à 3 heures. Ainsi, l'équipe de S. Waddell a montré que la transmission synaptique de ces neurones était requise pendant l'apprentissage et la consolidation mais pas pendant le rappel (Krashes et al., 2007). Par ailleurs, à l'aide d'une sonde G-CamP, rapporteur de l'activité Ca^{2+} , il a été démontré récemment qu'une trace mnésique était progressivement détectée dans les lobes α'/β' des CPs jusqu'à une heure après conditionnement mais pas dans les lobes α/β , γ . Cette trace mnésique est dépendante de la protéine $G\alpha_s$ et donc de la voie AMPc (Wang et al., 2008).

2.3.2.4 Rôle des neurones inhibiteurs GABAergiques

Des neurones inhibiteurs GABAergiques projetant sur les CPs sont impliqués dans la formation de la mémoire appétitive chez l'abeille. L'activité électrique de ces neurones diminue après apprentissage lors de la présentation de l'odeur associée au sucre (Grunewald, 1999; Grunewald, 1999). Récemment des neurones GABAergiques similaires projetant sur les CPs ont été identifiés chez la drosophile, les neurones APL (antérieur pair latéral) (**Fig. 17**). Les corps cellulaires (un dans chaque hémisphère) sont situés latéralement par rapport aux calices, à côté du LH. Chaque neurone envoie deux projections qui innervent largement les CPs : une qui projette sur les calices et le pédoncule, l'autre qui entre au niveau des lobes verticaux des CPs et innerve tous les lobes. Ainsi, tous les CPs reçoivent des afférences de ces neurones, exceptées les corps cellulaires. Le blocage de la synthèse du neurotransmetteur GABA dans ces neurones permet une augmentation et une facilitation de la formation de la MCT. Par ailleurs, l'imagerie in vivo a révélé l'existence d'une trace mnésique dans ces neurones entre 30 secondes et 5 minutes après conditionnement ; l'activité calcique diminuant fortement après un protocole court (Liu and Davis, 2009). La surexpression du récepteur au GABA, RDL (resistance to dieldrin) dans les CPs entraîne un défaut d'apprentissage alors que la perte de fonction entraîne une facilitation de la formation de la MCT similaire à celle observée lors du blocage des neurones GABAergiques (Liu et al., 2009; Liu et al., 2007). Enfin, la surexpression de RDL dans les CPs diminue la réponse calcique à l'odeur mais pas au choc électrique (Liu et al., 2007). Ces différents résultats suggèrent que la voie GABAergique joue un rôle important pendant l'apprentissage, en régulant la réponse aux odeurs des CPs via le récepteur RDL.

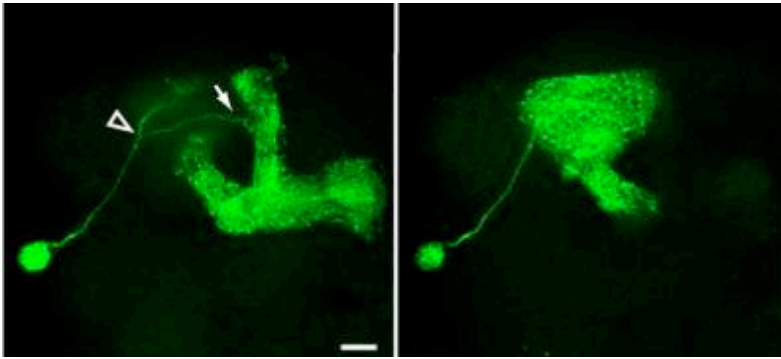


Figure 17 : Morphologie du neurone APL GABAergique.

Un exemple de clone cellulaire d'un neurone APL, visualisé par mCD8-GFP. La projection partant du corps cellulaire bifurque (tête de flèche) au niveau du protocérébrum médian pour former deux branches. L'une entre au niveau des lobes verticaux (flèche, image de gauche) et l'autre au niveau des calices des CPs (image de droite). L'échelle représente 20 μm . (Liu and Davis, 2009)

2.3.2.5 Récapitulatif

L'ensemble de ces données indique que la formation d'une mémoire associative requiert une activation séquentielle des CPs : les lobes α'/β' sont tout d'abord requis pendant l'apprentissage et la consolidation puis les lobes α/β et γ pendant la restitution. Pourtant, l'adénylate cyclase Rut est considérée comme le détecteur de coïncidence de l'apprentissage associatif et l'expression d'un transgène rut dans les seuls lobes α/β et γ suffit à sauver le défaut de mémoire observé dans le mutant *rut*. Ainsi, ces deux résultats semblent contradictoires mais il est possible que les lobes α'/β' activent les α/β et γ remettant potentiellement en cause le modèle de la détection de coïncidence.

2.4 La mémoire à moyen terme

La mémoire à moyen terme est une mémoire labile formée après un protocole court et dure entre une heure et cinq heures. Pour le moment, nous ne savons pas si cette MTM est issue de la transformation de la MCT ou bien si elle est formée en parallèle. Toujours est-il que les mutants de MCT sont également mutants pour la MMT, ce qui suggère que cette mémoire dépend fortement de la MCT et notamment des mêmes voies biochimiques, comme celle de l'AMPC.

Cependant, plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires jouant un rôle plus tardif dans la formation de la mémoire ont été identifiés.

2.4.1 Mécanismes moléculaires de la formation de la mémoire à moyen terme

2.4.1.1 PKA

Le rôle de la PKA dans la formation de la MMT a été extensivement étudié. L'induction de la PKI une heure avant le conditionnement entraîne un défaut de mémoire à 2 heures et à 4 heures (Drain et al., 1991). De la même façon, les mutants de la sous-unité catalytique *DCO* présentent une mémoire plus faible entre 60 et 180 minutes (Skoulakis and Davis, 1996). Ces résultats semblent donc indiquer que la PKA jouerait effectivement un rôle dans la formation de la MMT. Cependant, une réduction de 50% de l'expression de *DCO* ne suffit pas à induire un défaut de mémoire entre 1 et 7 heures (Horiuchi et al., 2008).

2.4.1.2 *amnesiac (amn)*

L'un des tous premiers mutants de mémoire olfactive identifiés est *amnesiac (amn)*. Celui-ci présente des défauts de MMT mais pas de MCT (Quinn et al., 1979). Le gène a été identifié plus tardivement, grâce à une lignée élément P qui était capable de sauver le phénotype de stérilité de *dnc* (Feany and Quinn, 1995). Le peptide Amn possède une certaine similarité avec un peptide activateur d'adénylate cyclase. Même si le rôle biochimique d'Amn reste inconnu à ce jour, les données génétiques et moléculaires suggèrent qu'Amn jouerait un rôle important dans la régulation de la voie AMPc.

2.4.2 Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire à moyen terme

2.4.2.1 *Neurones DPM*

Le peptide Amn n'est pas exprimé dans les CPs mais dans les neurones DPM (dorsal paired medial). Les deux corps cellulaires des DPM (un dans chaque hémisphère) sont situés dorsalement dans le cerveau et projettent sur les lobes des CPs et sur la base du pédoncule. L'expression d'un transgène *amn*⁺ dans les neurones DPM sauve le déficit de mémoire observé dans les mutants *amn* aussi bien pour la mémoire aversive que pour la mémoire appétitive (Keene et al., 2006; Waddell et al., 2000) (**Fig. 18**).

Par ailleurs, le blocage de la neurotransmission des DPM par *shi*^{ts} entraîne un défaut de mémoire similaire à celui observé dans les mutants *amn* (Waddell et al., 2000). La signalisation des neurones

DPM n'est requise que pendant la consolidation (Keene et al., 2004), et plus précisément dans les 30 minutes suivant le conditionnement (Keene et al., 2006). Afin de déterminer avec plus de précisions quels lobes sont activés par les DPM, le groupe de S. Waddell a surexprimé une forme de la protéine DScam dans ces neurones, provoquant une perte spécifique des projections sur les lobes α/β et γ . Dans ce cas, la MTM est normale, indiquant que ce sont les lobes α'/β' qui sont activés par les DPM pendant la consolidation. Le blocage spécifique par *shi^{ts}* de ces projections entraîne bien un défaut de MTM, confirmant ainsi le rôle de ces lobes pendant la consolidation (Keene et al., 2006).

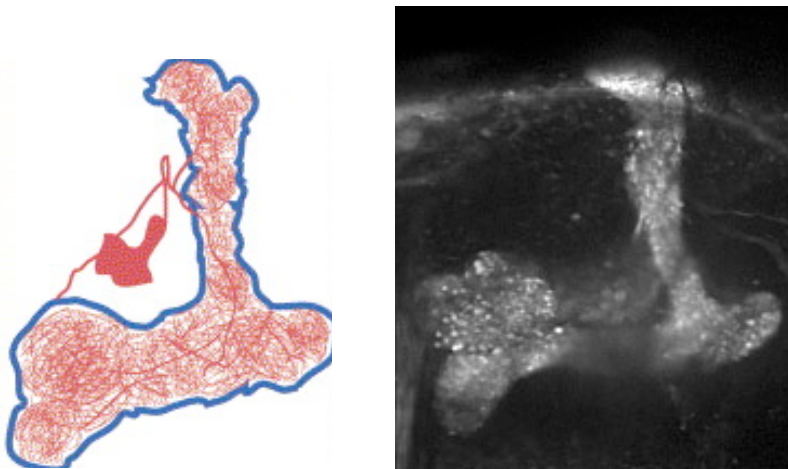


Figure 18 : Les neurones DPM projettent sur les corps pédonculés avec un unique neurite.

Représentation schématique d'un neurone DPM (gauche) et visualisation du profil d'expression d'un neurone DPM dans la lignée MZ717 par expression de mCD8-GFP (droite). Le corps cellulaire est représenté en rouge foncé et est situé postérieurement aux corps pédonculés.

L'imagerie *in vivo* par des sondes G-CaMP et synaptophluorin ont révélé que les neurones DPM répondent aussi bien au choc électrique qu'à l'odeur. L'association du choc électrique avec l'odeur augmente l'activité calcium dans ces neurones en réponse à l'odeur conditionnée. Cette augmentation est détectable dans les 30 min suivant le conditionnement, lorsque la neurotransmission des DPM est requise. Qui plus est, cette trace mnésique est spécifique à la branche des DPM projetant sur les lobes verticaux des CPs et ne se forme pas dans les mutants *amn* (Yu et al., 2005). Ainsi, la présence d'Amn dans les DPM est requise pour la formation d'une trace mnésique. Or, une trace mnésique dépendante d'*amn* est détectée à court-terme alors que le mutant *amn* présente un défaut de MMT mais pas de MCT. Il est possible que la protéine Amn joue un rôle précocément mais pour la consolidation de mémoires plus tardives. Par ailleurs, les neurones DPM pourraient également synthétiser de l'acétylcholine (Keene et al., 2004) ; ainsi ce neurotransmetteur pourrait directement être impliqué dans la stimulation des CPs.

Ces différents résultats de blocage synaptique et d'imagerie in vivo des DPM confirment ainsi le rôle des lobes α'/β' des CPs pendant la consolidation. Amn étant potentiellement un neuropeptide capable d'activer une adénylate cyclase, il pourrait activer Rut par l'intermédiaire d'une protéine G afin de permettre la formation de la MMT. Cependant, il est surprenant qu'Amn puisse être requis pour la formation d'une trace mnésique dans les lobes α'/β' trente minutes après conditionnement alors que le mutant *amn* ne présente pas de défaut de mémoire à un temps aussi précoce. Par ailleurs, l'expression de Rut dans les lobes α/β et γ est suffisante pour sauver la perte de MMT observée dans le mutant *rut*. Ainsi, Amn pourrait diffuser au niveau des lobes α/β et γ et activer Rut en se fixant à un récepteur couplé à une protéine G. L'hypothèse la plus probable serait que les neurones α'/β' et DPM forment une boucle de renforcement mutuel qui stabiliserait l'activité AMPc dans les lobes α/β et γ et notamment pour la formation de mémoire plus tardives.

3 Les mémoires consolidées

3.1 Mémoire résistante à l'anesthésie

La mémoire résistante à l'anesthésie est une mémoire semi-consolidée formée après les protocoles court et massé et indépendant de la synthèse protéique *de novo*. Elle pourrait impliquer majoritairement des changements post-traductionnels de protéines déjà synthétisées avant apprentissage. Contrairement aux MCT/MMT, les voies biochimiques impliquées dans la formation de cette mémoire restent très peu détaillées à ce jour.

Par ailleurs, le rappel de la MRA est facilité par les interactions sociales. En effet, des mouches testées en groupe ont une meilleure mémoire à 24 heures après un conditionnement massé que des mouches testées individuellement. Cet effet n'est visible qu'après un conditionnement massé et aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Enfin, cette augmentation de mémoire n'est pas liée à un phénomène passif d'agrégation mais bien à une facilitation du rappel de la MRA. Ce phénomène pourrait être lié à la libération de « molécules de stress », telles que le CO₂ en présence de l'odeur CS+ (Chabaud).

3.1.1 Mécanismes moléculaires de formation des mémoires consolidées

Chez le mutant *radish* (*rsh*), la perte de mémoire est plus importante après plusieurs heures que juste après le conditionnement, et la mémoire résiduelle est effacé par une anesthésie par le froid (Folkers et al., 1993). Ainsi, la protéine codée par le gène *rsh* est requise pour la consolidation d'une mémoire résistante à l'anesthésie. Le mutant *rsh* présente également un défaut de mémoire olfactive après un protocole espacé (Tully et al., 1994).

Le clonage du gène a tout d'abord identifié la phospholipase A2 comme étant le gène responsable du déficit de MRA dans le mutant *rsh* (Chiang et al., 2004). Cependant, il s'est avéré que ce gène était éloigné de près de 95kb de la délétion qui produisait un défaut de mémoire identique à celui obtenu dans le mutant *rsh*. Une seconde étude a identifié le gène CG15720 comme étant le gène muté dans *rsh*. L'allèle *rsh*^l présente une mutation dans sa phase de lecture, codant pour une protéine tronquée. L'expression d'un transgène *rsh*⁺ chez l'adulte permet de sauver le phénotype observé dans le mutant *rsh*. La protéine Rsh est très fortement exprimée dans les CPs,

suggérant que la formation de la MRA a lieu dans les CPs (Folkers et al., 2006). Même si la fonction moléculaire de Rsh reste inconnue à ce jour, la protéine codée par le gène CG15720 présente de nombreux sites de phosphorylation par la PKC et la PKA. Ainsi, la PKA pourrait également jouer dans la consolidation de la MRA.

Récemment, il a été découvert qu'une activité de 50% de la PKA dans des mutants hétérozygotes DCO/+ entraîne une augmentation de la mémoire entre 3 à 5 heures après conditionnement. Cette augmentation de mémoire perdue après application d'un choc par le froid, suggérant que cette extra-mémoire est de la MRA. Par ailleurs, l'expression d'une PKA sauvage dans les CPs inhibe la formation de cette extra-mémoire chez un mutant hétérozygote DCO/+ (Horiuchi et al., 2008). Ces résultats ne contredisent pas nécessairement ceux obtenus sur le rôle de la PKA pendant l'apprentissage. En effet, dans ces études, une chute d'activité de la PKA entre 16 et 24% est requise pour entraîner des défauts d'apprentissage (Li et al., 1996; Skoulakis et al., 1993). Ainsi, la PKA jouerait un rôle inhibiteur sur la formation de la MRA en plus de son rôle positif sur la formation des MCT et MMT.

La protéine kinase M atypique (aPKM) est une isoforme tronquée et constitutivement active de la protéine kinase C atypique. La surexpression de cette aPKM après conditionnement augmente la mémoire après un protocole massé, alors que son inactivation la diminue. Alors que Rsh possède des sites de phosphorylation par la PKC, l'augmentation de MRA due à la surexpression de l'aPKM perdue dans un mutant *rsh* (Drier et al., 2002). Ainsi, l'aPKM jouerait un rôle dans la formation et la consolidation de la MRA indépendamment ou en aval de Rsh. Néanmoins, les mécanismes et les lieux d'action de l'aPKM restent inconnus à ce jour.

3.1.2 Mécanismes cellulaires de formation de la mémoire résistante à l'anesthésie

Les CPs sont impliqués dans l'acquisition, la consolidation et la restitution des mémoires à court terme. Mais qu'en est-il de la MRA ?

L'application d'un choc par le froid après un cycle de conditionnement efface les mémoires sensibles à l'anesthésie mais laisse intacte la MRA. Ainsi, il a été montré au laboratoire que le blocage des lobes α/β des CPs suivis d'un choc par le froid entraîne un défaut de MRA, alors que le blocage des lobes γ n'a pas d'incidence (Isabel et al., 2004). Ainsi, les lobes α/β des CPs sont requis pour la restitution de la MRA. Ce résultat a démontré pour la première fois l'importance des

CPs pour la formation de la MRA, confirmé par le profil d'expression de Rsh, et notamment des lobes α/β pendant la restitution.

3.2 Mémoire à long terme

La mémoire à long terme est formée après cinq ou dix cycles de conditionnement espacés. Elle est stable au cours du temps (consolidée) et nécessite une synthèse protéique *de novo* (Tully et al., 1994). La formation de MLT reposerait principalement sur le renforcement et la création de nouvelles synapses (plasticité synaptique). La formation de la MLT reposerait aussi sur la voie de l'AMPC, les différents mutants pour cette voie présentant des défauts de MLT (Lu et al., 2007; Yu et al., 2006)

3.2.1 Mécanismes moléculaires de formation de la mémoire à long terme

3.2.1.1 *Régulation de la transcription*

La PKA, en réponse à une augmentation de l'AMPC cellulaire peut activer ses cibles potentielles, notamment des facteurs de transcription. Peu d'études ont démontré un rôle direct de la PKA dans la MLT chez la drosophile. Néanmoins, des travaux récents ont étudié le rôle d'une protéine de d'ancrage à la PKA (AKAP) dans la formation de la MLT. L'AKAP Yu est une protéine capable de fixer la PKA, restreignant ainsi son activité à un ensemble de cellules. Elle est exprimée fortement dans les lobes α'/β' des CPs, et le mutant *yu* présente un défaut spécifique de MLT. L'expression d'un transgène *yu* dans les CPs d'une mouche adulte, sauve la perte de MLT observée dans le mutant *yu* (Lu et al., 2007), suggérant un rôle physiologique de cette AKAP et montrant ainsi l'importance de la localisation de la PKA dans la formation de la MLT.

La PKA serait capable d'activer des facteurs de transcription de la famille Creb, en réponse à une augmentation d'AMPC (Bacskai et al., 1993). Le gène *creb2* est un gène complexe codant pour au moins sept isoformes différentes dont la forme dCreb2-a, activatrice et dCreb2-b répresseur de la transcription de gènes (Yin et al., 1995b). Lorsque le répresseur dCreb2-b est surexprimé chez l'adulte (Perazzona et al., 2004; Yin et al., 1994), la MLT est perturbée, indiquant que l'activation de la transcription de gènes par Creb est requise pour l'élaboration de cette mémoire. Il a d'abord

été décrits que la surexpression de dCreb-a chez la drosophile était capable d'augmenter le MLT (Yin et al., 1995a). Cependant, il s'est avéré que ces résultats n'étaient pas reproductibles, notamment car il existait une mutation dans le transgène qui codait ainsi pour une protéine tronquée. La surexpression de la bonne isoforme dCreb2-a entraîne une létalité importante (Perazzona et al., 2004) due à l'activation ectopique de gènes en aval de Creb. Ainsi, la protéine Creb jouerait un rôle important dans la formation de la MLT via son rôle d'activateur de la transcription ; néanmoins il reste encore à déterminer s'il existe des isoformes activatrices capables d'augmenter la MLT.

Un autre mutant a permis de démontrer l'importance de la régulation des voies de transcription pour la formation de la MLT. Le gène *Notch* code pour une protéine transmembranaire. En réponse à la fixation de ligands tels que Delta sur sa partie extra-cellulaire, la partie cytoplasmique est alors clivée et rentre dans le noyau pour réguler l'expression de gènes (Kidd et al., 1998; Schroeter et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998). Chez les mammifères, Notch est également impliqué dans le contrôle de la croissance des axones et des dendrites (Sestan et al., 1999). Afin d'étudier le rôle de Notch chez les adultes tout en s'affranchissant des défauts de développement, deux équipes ont utilisé des mutants conditionnels, un allèle thermosensible (Presente et al., 2004) et un dominant négatif (Ge et al., 2004). Ainsi, l'inactivation de Notch chez l'adulte entraîne un défaut de MLT alors que les MCT et MRA sont normales. La répression du gène *Notch* dans les CPs conduit à un défaut de mémoire similaire (Presente et al., 2004). Enfin, les mouches sont capables de former de la MLT après un cycle ou deux cycles de conditionnement, un protocole qui n'est normalement pas capable d'induire de la MLT, lorsqu'un transgène *Notch* est surexprimé chez l'adulte (Ge et al., 2004). Ces différents résultats démontrent donc l'importance de Notch pour la formation de la MLT.

Récemment, un partenaire potentiel de Notch jouant un rôle dans la formation de la MLT a été identifié. Le gène *neuralized* (*neur*) code une ubiquitine ligase E3, nécessaire pour la régulation de Notch pendant la neurogenèse. Neur peut ubiquitiner le ligand de Notch, Delta, et induire son endocytose. Ce mécanisme permet de générer les fragments intra-cellulaires de Notch qui sont ensuite transportés dans le noyau afin de réguler la transcription (Pavlopoulos et al., 2001). Chez l'adulte, la protéine Neur est exprimée dans les CPs et plus particulièrement dans les zones périphériques des lobes α/β . Le mutant hétérozygote *neur* présente un défaut de MLT spécifique et la sur-expression de *neur*⁺ dans les neurones périphériques des lobes α/β augmente la MLT à 24 heures (Pavlopoulos et al., 2008). Ces résultats confirment l'importance de la voie Notch dans la

formation de la MLT. Néanmoins, il reste à découvrir l'identité du ligand de Notch et les gènes en aval régulés par cette voie de signalisation.

3.2.1.2 Régulation de la traduction

À l'aide d'un crible comportemental et d'une étude de puces à ADN, plusieurs protéines impliquées dans la localisation des ARNm et dans la traduction ont été décrites comme jouant un rôle dans la formation de la MLT (Dubnau et al., 2003) :

- Pumilio, un répresseur de la traduction dont le rôle dans la régulation de la traduction localement dans les oocytes a été démontré
- Staufen et Oskar, impliqués dans la translocation de ribonucléoprotéines
- eIF-5, un facteur d'initiation de la transcription

Ces protéines sont exprimées majoritairement dans les CPs, et les mutants génétiques codant pour ces protéines présentent tous des défauts de MLT. Ces différents résultats montrent que la formation de la MLT requiert une régulation de la traduction des ARNm localement, soit au niveau des calices post-synaptiques, soit dans les lobes pré-synaptiques.

Une autre étude a montré l'importance de la régulation de la synthèse protéique, et notamment de la voie de la kinase II calmoduline-dépendante (CamKII), impliquée dans la plasticité synaptique chez les mammifères pour la formation de la MLT (Kelleher et al., 2004). A l'aide d'une CamKII taguée il a été montré que la formation de MLT requiert un adressage précis de cette protéine au niveau post-synaptique dans les neurones de projection. Par ailleurs, la régulation de la synthèse protéique au niveau synaptique dépend du complexe RISC, impliqué dans le mécanisme d'ARN interférence (Ashraf et al., 2006).

3.2.1.3 Régulation post-traductionnelle et plasticité synaptique

L'activation de la transcription de gènes par CREB et la régulation de la transcription et la traduction permettent des modifications structurelles de neurones permettant une stabilisation des traces mnésiques.

Plusieurs gènes ayant un rôle potentiel dans cette plasticité synaptique ont été identifiés.

Le gène *tequila* (*teq*) code pour une sérine protéase et est l'homologue humain de la neurotrypsine, associée à des retards mentaux non-syndromiques (Molinari et al., 2002). Les sérine protéases sont impliqués dans un large éventail de mécanismes neuronaux, comme la croissance des axones, la dégradation des synapses et la plasticité structurelle (Molinari et al., 2003). L'inactivation du gène *teq* dans les CPs uniquement chez des mouches adultes entraîne un défaut spécifique de MLT. Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de *tequila* augmente d'un facteur 30 après

conditionnement, et notamment dans le pédoncule suggérant un rôle physiologique de la protéine après conditionnement pour la plasticité synaptique (Didelot et al., 2006). Les résultats obtenus sur *teq* et la forte homologie de la protéine avec son homologue humain ont permis de clarifier le rôle postnatal d'une mutation du gène codant pour la neurotrypsine chez l'enfant.

Le mutant *crammer (cer)*, codant pour une cathepsine, protéine inhibitrice des cystéine protéases, a été identifié au laboratoire comme jouant un rôle spécifique dans la formation de la MLT. L'expression de l'ARNm de *cer* diminue de 70% trois heures après un conditionnement long et la surexpression d'un transgène *cer*⁺ dans les cellules gliales entraîne un défaut de MLT. Ces expériences ont permis de montrer pour la première fois un rôle des cellules gliales dans la formation de la MLT (Comas et al., 2004). Certaines cellules gliales pourraient jouer un rôle similaire à des neurones en intégrant des signaux et en modulant l'activité synaptique (Kurosinski and Gotz, 2002) et Cer pourrait être impliqué dans la plasticité synaptique par la modulation des connections entre les cellules gliales et les neurones.

3.2.2 Réseaux neuronaux impliqués dans la formation de la MLT

Quelles sont les structures requises pour la formation de la MLT ?

Le blocage des neurones α/β , mais pas des neurones γ , à l'aide du transgène *UAS-Shi^{ts}* entraîne un défaut de MLT, indiquant que la neurotransmission de ces neurones est requise pendant le rappel (Isabel et al., 2004).

Par ailleurs, les mouches *ala* sans lobes verticaux (**Fig.16**) ont une MLT abolie alors que les MCT et MRA sont normales. De plus, les mouches *ala* sans lobes médians ont des MCT, MRA et LTM normales (Isabel et al., 2004; Pascual and Preat, 2001). L'ensemble de ces résultats indique donc que la trace mnésique de la MLT serait localisée dans les lobes verticaux des CPs et plus particulièrement dans les lobes α .

Ces résultats fonctionnels ont été confirmés récemment par imagerie calcique. L'expression de la GCaMP dans les neurones α/β a révélé une trace mnésique après le protocole long. La réponse calcique est inchangée pendant la MCT mais est augmentée de manière significative dans les lobes α verticaux. Par ailleurs, cette trace mnésique est absente lorsque la synthèse protéique est bloquée par la CXM ou lorsque la forme inhibitrice de Creb est exprimée dans les CPs. Enfin, la trace mnésique est bloquée dans le mutant *amn*, suggérant un rôle de ce gène et potentiellement des

neurones DPM dans la formation de la MLT (Yu et al., 2006). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une trace mnésique soit détectée dans les neurones DPM innervant les lobes verticaux (Yu et al., 2005).

Récemment, une étude a montré que le corps en ellipse pourrait également jouer un rôle dans la formation de la MLT. L'inhibition de l'expression des récepteurs au NMDA pendant la consolidation dans le corps en ellipse entraîne un défaut de MLT. Par ailleurs, un défaut de MLT est observé lorsque la neurotransmission des CPs est bloquée pendant l'apprentissage et la consolidation et lorsque le corps en ellipse est bloqué pendant le rappel. Les auteurs envisagent ainsi qu'une partie de la trace mnésique formée dans les CPs pourrait être transférée au corps en ellipse pendant la consolidation et que la neurotransmission des CPs et du corps en ellipse serait requise pendant le rappel de la MLT (Wu et al., 2007). Néanmoins, l'expression de *shi^{ts}* dans les CPs avec le pilote d'expression OK107, utilisé dans cette étude, entraîne des défauts d'olfaction à température restrictive (McGuire et al., 2001). Ainsi, le rôle des CPs pendant ces deux phases reste encore à déterminer.

Enfin, une autre étude a montré que la formation de la MLT induisait un changement dans la synthèse de la kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante (CamKII) au niveau des LA (Ashraf et al., 2006). Il serait intéressant d'étudier plus en détails cette plasticité des LA après un conditionnement olfactif, afin de déterminer dans quelle mesure ils jouent un rôle dans l'élaboration de la mémoire olfactive et quels neurones sont modifiables par expérience.

3.3 Dynamique des phases de mémoire

Quelles sont les relations entre ces différents types de mémoire ? Nous avons pu voir précédemment que les voies de MCT, MMT et MLT sont liées et interagissent dynamiquement puisque toutes dépendent assez largement de la voie de l'AMPC et de la PKA.

Le premier modèle proposait que les mémoires labiles (MCT et MMT) sont d'abord formées séquentiellement puis transformées progressivement en mémoires consolidées (MRA et MLT). L'observation d'une chute de mémoire dans le mutant *radish* après cinq cycles de conditionnement espacé a suggéré aux auteurs que la MRA serait formée après ce protocole long et que la mémoire présente à 24 heures serait un mélange de MRA et de MLT (Tully et al., 1994) (**Fig. 20-A**). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la plupart des mutants de MLT ou que des mouches nourries

avec un inhibiteur de la synthèse protéique ont des scores de mémoire seulement 50% inférieur à celui des mouches sauvages. Néanmoins, plusieurs résultats semblent contredire ce modèle.

Une MCT est encore mesurable chez les mutants amorphes *dnc* et *rut* (Tully and Quinn, 1985). Par ailleurs, il a été montré que les protéines hétérotrimériques couplées aux GPCR joueraient un rôle pendant l'apprentissage, indépendamment de *rut* (Ferris et al., 2006). Enfin, après une anesthésie par le froid, la mémoire restante à 2 heures dans le mutant *rut* est identique à celle de mouches sauvages, suggérant que la formation de MRA ne dépend pas de la voie AMPc (Isabel et al., 2004) (**Fig. 19**). Ces deux résultats suggèrent donc, qu'il existe un apprentissage indépendant de l'AMPc ou dépendant d'une autre adénylate cyclase, et que cette deuxième voie pourrait être impliquée dans la formation de la MRA.

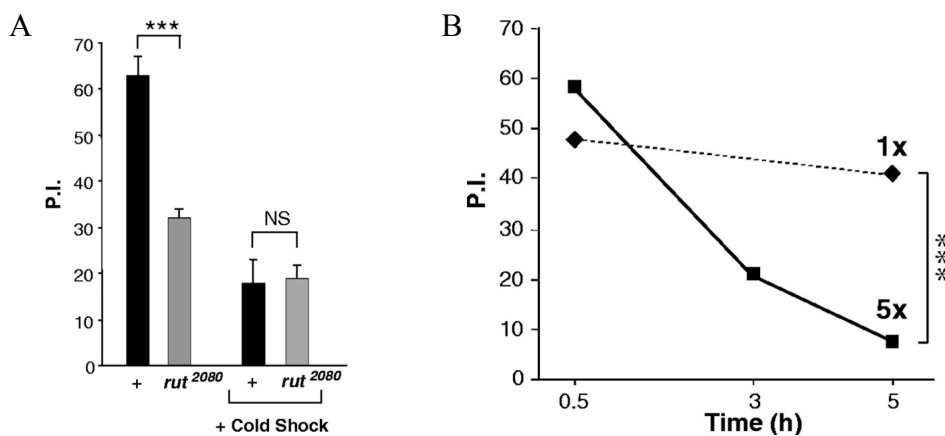


Figure 19 : La MRA est normale dans le mutant *rut* et est effacée après un conditionnement espacé.

(A) La mémoire a été mesurée à 2 heures après un cycle de conditionnement. Un choc par le froid de 2 minutes est administré une heure après le conditionnement (+ Cold Shock). Après un choc par le froid, le mutant de MCT *rut* présente une mémoire résiduelle identique à la souche de référence. (B) Le mutant *ala* a été conditionné par un protocole court (ligne pointillée) ou un protocole long (ligne continue). La mémoire à 5 heures des mouches *ala* sans lobes verticaux conditionnées avec le protocole long est significativement inférieure à celle conditionnées avec le protocole court.

Quelles sont les relations entre MRA et MLT ? La mémoire à 5 heures des mouches *ala* sans lobes verticaux après le protocole long est quasiment nulle alors que la mémoire à 30 minutes est normale. Par ailleurs, après un cycle de conditionnement, les mémoires à 30 min et 5 heures des mutants *ala* sans lobes verticaux est comparable à celle des individus sauvages. Étant donné que les mouches *ala* sans lobes verticaux ont une mauvaise MLT, la seule mémoire mesurable à 5 heures est la MRA, la MMT ayant presque intégralement disparue à ce temps. Ainsi, la répétition espacée de cycles de conditionnement permettrait un effacement progressif de la MRA, même en l'absence

de MLT et les deux grand types de mémoires consolidées seraient exclusives chez la drosophile (**Fig 20-B**). Il a été proposé que la MRA pourrait être un verrou à la formation de la MLT évitant ainsi l'activation de l'expression d'une lourde cascade de gènes, coûteuse pour l'organisme (**Fig. 20-B**) (Mery and Kawecki, 2005). La PKA pourrait jouer un rôle important dans la transition entre ces deux phases parallèles en ayant un rôle positif sur la formation des mémoires dépendantes de la voie AMPc (Drain et al., 1991; Lu et al., 2007) et négatif sur la formation de la MRA (Horiuchi et al., 2008).

Cette exclusivité des deux types de mémoires consolidées est également visible dans des populations naturelles. En effet, des lignées de drosophile ont été sélectionnées sur plusieurs générations pour leurs meilleures capacités mnésiques dans un test d'oviposition. Ces lignées présentent également des performances mnésiques supérieures à la moyenne de mouches sauvages dans un test de mémoire olfactive aversive au choc mais surtout, celles qui ont une meilleure MRA ont une moins bonne MLT et vice versa (Mery et al., 2007).

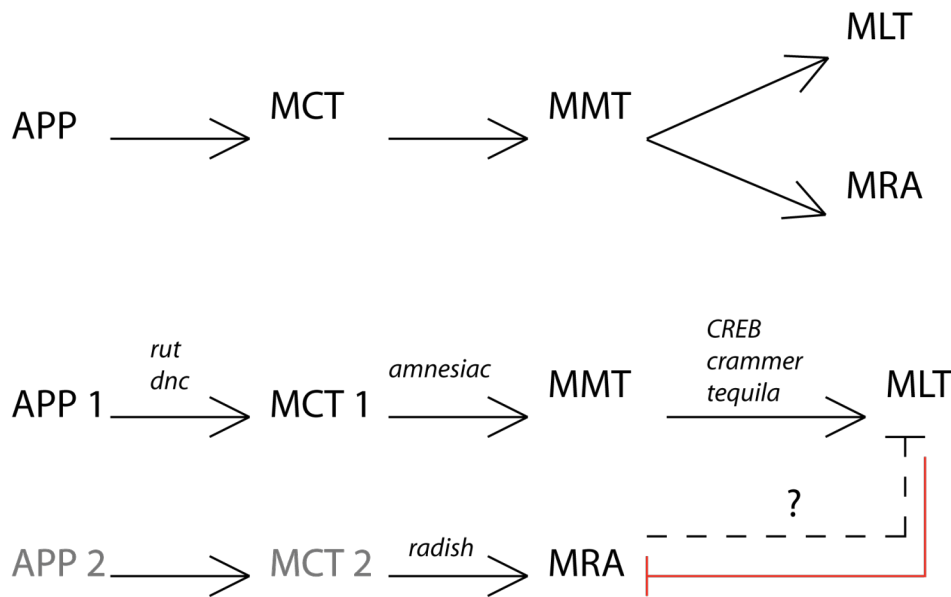


Figure 20 : Dynamique des phases de mémoire.

Les phases de mémoire formées après un conditionnement aversif olfactif. A : Modèle classique. Les produits des gènes *dunce*, *rutabaga*, *amnesiac* jouent un rôle dans la formation de la MCT et de la MMT par la régulation de la voie AMPc. Deux types de mémoire consolidées existent. La MLT, dépendante de la synthèse protéique est formée après un protocole espacé et requiert les produits des gènes *CREB*, *crammer* et *tequila*. La MRA est formée après les protocoles court, massé et long et requiert le produit du gène *radish*. La MRA et la MLT coexisteraient donc après un conditionnement long. B : modèle alternatif. Deux voies d'apprentissage parallèles sont distinguées. La première dépend de la voie AMPc. La seconde permet la formation de MRA et est indépendante de l'AMPc. A long terme, la MLT efface la MRA et de manière réciproque, la MRA pourrait bloquer la formation de la MRA.

Peu d'éléments récents ont permis de valider définitivement l'un des deux modèles de la dynamique des phases de mémoire. Les deux principaux mutants utilisés pour l'étude de la dynamique des phases, *rsh* et *ala*, peuvent tous les deux jouer un rôle pendant le développement et ainsi ne pas refléter totalement ce qui se passe physiologiquement chez l'adulte. Ainsi il est nécessaire d'identifier de nouveaux mutants de MRA afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation de cette mémoire consolidée et la relation entre les différents types de mémoire consolidée. Pendant ma thèse, j'ai donc cherché à identifier de nouveaux mutants de MRA par un crible de lignées GAL4 ayant une expression préférentielle dans les CPs, siège de la MRA.

En parallèle j'ai cherché de nouveaux réseaux de neurones reliés aux CPs et pouvant jouer un rôle dans le rappel. En effet, même si de nombreuses données anatomiques et d'imagerie ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des réseaux de neurones pour la formation de la mémoire,

de nombreux points restent à éclaircir, et notamment comment l'information sort des CPs. Pendant ma thèse, j'ai donc cherché des neurones extrinsèques aux CPs jouant un rôle pendant le rappel de la MLT.

Matériel et Méthodes

1 Génétique

Les drosophiles sont élevées sur un milieu maïs-agar-levure à 18°C et à une humidité relative de 50%, dans des conditions d'éclairage de 12 heures de jour/12 heures de nuit.

La souche de référence est *Canton Special (Cs)*. Les différentes lignées utilisées pour le comportement sont placées dans le même fonds génétique afin de s'affranchir d'éventuelles mutations compensatoires pouvant influencer le phénotype observé. Ainsi, chaque lignée est croisée cinq fois à la souche w^{1118} (qui est dans un fonds génétique Cs) puis rendue homozygote quand c'est possible.

Les différents croisements ont tous été effectués entre des individus homozygotes, excepté pour la lignée NP677, létale homozygote.

2 Comportement

2.1 **Conditionnement aversif olfactif classique**

Le protocole de conditionnement aversif utilisé a été mis au point dans le laboratoire de Seymour Benzer (Quinn et al., 1974) puis progressivement amélioré (Pascual and Preat, 2001; Tully et al., 1994; Tully and Quinn, 1985).

La veille du conditionnement, une centaine de mouches âgées de 24 à 72 heures sont placées dans des bouteilles fraîches, et conservées dans une étuve réservée une nuit à 18°C et 50% d'humidité (sauf dans le cas d'expériences avec Gene-Switch, cf. 2.2). Elles sont ensuite transférées dans la pièce à comportement 30 min avant le début de l'expérience. Les expériences de comportement ont lieu à 25°C, 80% d'humidité (exceptées les expériences avec *shi^{ts}*, cf. 2.3).

Les odeurs utilisées sont le 4-méthyl-cyclohexanol (MCH) et le 3-octanol (OCT), deux alcools naturellement répulsifs pour les mouches. Les odeurs sont diluées dans 160 ml d'huile de paraffine dans une bouteille d'un litre aux concentrations de 3.6×10^{-4} M pour l'octanol et 3.25×10^{-4} M pour le

méthylcyclohexanol.

25 à 50 mouches sont introduites dans chacune des 6 chambres du barillet, recouvertes d'une grille électrifiable en cuivre. Le barillet est ensuite branché au circuit électrique et sur la circulation d'air à un débit de 2l/min de telle sorte que chaque compartiment reçoive un débit de 330 ml/min. L'ensemble est relié à un système informatique qui contrôle les différentes électrovannes assurant les débits d'air provenant des bouteilles d'odeurs, et la distribution des chocs électriques. Un cycle de conditionnement dure à peu près 300 secondes réparties comme suit :

- de 0 à 90 secondes, air
- de 91 à 150 secondes, odeur A associée à 12 chocs électriques de 60V
- de 151 à 195 secondes, air
- de 196 à 255 secondes, odeur B
- de 256 à 300 secondes, air

Un autre groupe de 25 à 50 mouches de même génotype et issues des mêmes bouteilles sont conditionnées en suivant, en inversant l'ordre des odeurs, l'odeur B devenant celle associée au choc électrique. Dans le cas d'un protocole long (ou conditionnement espacé), 5 cycles de conditionnement sont répétés avec une période de repos de 15 min entre chaque cycle (durée 1h 30). Dans le cas d'un protocole massé, 5 cycles de conditionnement sont répétés sans intervalle de repos (durée 25 min).

Comme pour le conditionnement, les mouches et les bouteilles d'odeur sont transférées dans la pièce 30 minutes avant le conditionnement. Le test est effectué dans un appareil en T (T-maze (Tully and Quinn, 1985)) relié à la paire de bouteilles d'odeur. Les groupes de mouches conditionnées au préalable sont introduits dans la partie centrale coulissante de la machine à test. Une fois les différents tuyaux connectés à la machine, la lumière est éteinte et l'ascenseur est descendu. Après une minute de test, la partie centrale est relevée afin de séparer les deux compartiments et les mouches sont récupérées et conservées. Les mouches conditionnées sur l'autre odeur mais issues du même lot sont testées en suivant.

L'indice de performance (IP) reflète le pourcentage de mouches ayant fait le bon choix lors du test (i.e. les mouches s'étant rappelé). Il est calculé en moyennant les deux scores obtenus lorsque les mouches ont reçu le choc électrique avec l'octanol ou lorsqu'elles l'ont reçu avec le méthylcyclohexanol, afin d'éliminer les biais dus à d'éventuelles différences de préparation entre les

deux odeurs.

$$\lambda_{1/2} = \frac{(CS-)-(CS+)}{(CS-)+(CS+)} \quad IP = \frac{\lambda_{1/2} \lambda_{-1/2}}{2}$$

CS+ : nombre de mouches ayant choisi le mauvais côté (celui précédemment associé au choc électrique)

CS- : nombre de mouches ayant choisi le mauvais côté.

$\lambda_{1/2}$: demi-score de performance pour les mouches conditionnées avec l'octanol comme CS+

$\lambda_{-1/2}$: demi-score de performance pour les mouches conditionnées avec le méthycyclohexanol comme CS+

2.2 Gene-Switch

Dans le cadre d'expériences utilisant le système Gene-Switch (Mao et al., 2004), des mouches âgées de 24 à 48 heures sont placées sur un milieu contenant 200 μ M de mifépristone pendant 48 heures à 25°C avant conditionnement. Après conditionnement, elles sont transférées à 18°C dans des bouteilles fraîches contenant 200 μ M de mifépristone jusqu'au test.

2.3 *shibire*^{ts}

Dans le cadre d'expériences avec le transgène UAS-*sh^{ts}* (Kitamoto, 2001), la température permissive est de 20°C, 80% d'humidité et la température restrictive 31°C, 70 % d'humidité. Les mouches sont par ailleurs transférées dans la pièce 30 min avant le conditionnement dans des bouteilles préchauffées quand le conditionnement a lieu à 31°C. Les mouches sont stockées à 18°C après conditionnement (sauf indication contraire) et transférées dans la pièce 30 minutes avant le test dans des bouteilles préchauffées quand le test a lieu à température restrictive.

2.4 Test de l'olfaction

Afin de vérifier les capacités olfactives des différentes lignées, un test d'olfaction après choc électrique est réalisé. En effet, il a été démontré que la sensibilité olfactive des mutants était plus faible après avoir reçu des chocs électriques) (Preat, 1998).

Les mouches sont introduites dans le barillet dans lequel elles vont recevoir des chocs électriques en présence de l'odeur 1 pendant une minute. Immédiatement, les mouches sont récupérées et placées dans la machine à test, où elles doivent choisir entre un compartiment avec de l'air et un autre avec l'odeur 2. Les odeurs utilisées étant aversives, les mouches ayant une olfaction normale vont majoritairement choisir le compartiment avec l'air. Après une minute de test, les mouches de chaque compartiment sont collectées séparément et comptées. Les scores obtenus ne prennent en compte qu'un demi-score de performance. Ce protocole permet également de vérifier que l'activité locomotrice des mouches est normale.

2.5 Evitement aux chocs électriques

Ce protocole permet de vérifier que la sensibilité aux chocs électriques et que la locomotion sont intacts dans les différentes lignées utilisées. Deux barillets recouverts de grilles électrifiables sont placés face à face en position horizontale et reliés par une pièce en plastique. Un seul des deux barillets est électrifié et les mouches doivent choisir entre les deux compartiments pendant une minute. Les mouches sont récupérées séparément, comptées et un indice de performance est calculé.

3 Biologie moléculaire

3.1 Extraction d'ADN

Le protocole d'extraction d'ADN utilisé est celui disponible en ligne sur le site : <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>

Une trentaine de mouches sont congelées puis écrasées dans 400µl de tampon

d'homogénéisation (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS). Le broyat est incubé à 65°C pendant 30 minutes. 800µl d'une solution de LiCl/KAc (1 volume de KAc 5M, et 2.5 volume de LiCl 6M) sont ajoutés et le mélange est incubé sur la glace pendant 10 minutes. La solution est ensuite centrifugée pendant 15min à température ambiante et la phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée. 600µl d'isopropanol sont rajoutés à la phase aqueuse et le mélange est vortexé brièvement puis centrifugé à 13.000 rpg pendant 15 minutes. Le surnageant est vidé et le culot d'ADN nettoyé avec de l'éthanol 70%. Le culot est alors resuspendu dans 150µl d'eau ou de Tris-EDTA.

3.2 Digestion/ligation

60 µl d'ADNg sont digérés toute une nuit à température ambiante avec 10 µl de tampon, 2 µl de RNase, 12 µl d'eau distillée et 16 µl de l'enzyme de restriction Xho I (l'élément P-GawB possède un site de restriction pour cette enzyme en amont du gène de résistance à l'ampicilline et de l'origine de réplication). L'enzyme est inactivée le lendemain en chauffant à 75°C pendant 1à minutes. Puis 10 µl de T4 DNA ligase, 40 µl de tampon 10X et 250 µl d'eau distillée. La ligation a lieu toute la nuit à 16°C. Les produits de ligation sont précipités par ajout de 16 µl de Li/Cl 6M et 600 µl d'isopropanol. Le mélange est laissé sur la glace pendant 30 minutes puis centrifugé à 13.000 rpg. Le culot est ensuite lavé avec 70% d'éthanol, séché et resuspendu dans 10 µl d'eau distillée.

3.3 Transformation et séquençage

Pour la transformation, 5 µl du produit de ligation précipité sont ajoutés à 30 µl de bactéries compétentes. Le mélange est vortexé légèrement puis laissé sur la glace pendant 5 minutes. Les bactéries sont étalées sur une boîte de pétri contenant de l'ampicilline puis mises en culture une nuit à 37°C. Les transformants sont récupérés le lendemain pour une mise en culture liquide dans du milieu LB.

Les ADN sont récupérés par une mini-prep (kit Qiagen) puis envoyés à séquencer.

4 Histologie

4.1 Coupes paraffines

Les mouches sont placées dans des colliers histologiques et fixées pendant 3 heures dans une solution de Carnoy (40 ml d'éthanol 100%, 20 ml de chloroforme, 10ml d'acide acétique). Elles sont ensuite déshydratées dans deux bains successifs d'éthanol 100% de 30 minutes, puis perméabilisées pendant 5 minutes dans un premier bain de méthylbenzoate puis dans un deuxième pendant toute une nuit.

Le lendemain, les colliers sont incubés dans un premier bain de méthylbenzoate + paraffine (50% pour chaque) pendant 3 heures à 65°C puis dans trois bains de paraffine pure d'au moins une heure chacun. Après le dernier bain, la paraffine et les colliers sont mis à solidifier en transférant à température ambiante puis gardées au réfrigérateur jusqu'au moment de la coupe.

Les colliers sont enlevés des blocs de paraffine, n'y laissant que les têtes. Ces blocs sont ensuite taillés et préparés pour le microtome. Les têtes sont coupées en section frontale de 7 µm et les rubans de paraffine sont déposés sur une solution d'albumine 3% et chauffés à 50°C. Après quelques minutes, le surplus d'albumine est enlevé et les lames mises à sécher à température ambiante toute une nuit.

4.2 Immunohistochimie

Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène de 30 minutes, déshydratées dans deux bains d'alcool 100% de 5 minutes et un bain d'éthanol 70% de 5 minutes. Elles sont ensuite réhydratées dans deux bains successifs de TNT 1X. Les lames sont saturées à plat avec du TNT 1X/sérum de cheval 10% pendant 30 minutes. Les lames sont incubées en chambre humide toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans du TNT 1X/sérum de cheval 10% (FAS II : dilution 1/5^{ème}, DCO : 1/1000^{ème}).

Le lendemain, les lames sont rincées dans trois bains successifs de TNT 1X pendant 5 minutes. L'incubation avec l'anticorps secondaire (1/250^{ème}) dilué dans du TNT 1X/sérum de cheval 10% se fait en chambre humide pendant 3 heures à température ambiante. Les lames sont rincées dans trois bains successifs de TNT 1X de 5 minutes puis le signal est amplifié par une incubation de 30 minutes dans un mélange avidine-biotine.

Les lames sont rincées dans trois bains de TNT 1X puis la coloration est effectuée par la DAB (3,3'-diaminobenzamidine). L'intensité du signal est observée sous une loupe binoculaire et la réaction est arrêtée lorsque la coloration est suffisante en plongeant les lames dans deux bains de TNT 1X. Les lames sont montées avec du milieu de montage aqueux Dako.

Résultats

1 Identification d'un nouveau mutant de mémoire résistante à l'anesthésie

1.1 Crible

Afin d'identifier de nouveaux mutants de MRA, un crible a été initié au laboratoire. 61 lignées GAL4 ont été sélectionnées pour leur expression préférentielle dans les corps pédonculés, siège de la MRA (de Belle and Heisenberg, 1994; Isabel et al., 2004). Ces différentes lignées proviennent du laboratoire de Douglas Armstrong (Université d'Edimburgh, <http://www.fly-trap.org>), du consortium japonais DGRC (Kyoto, <http://www.dgrc.kit.ac.jp/en/index.html>) et d'une mutagenèse réalisée au laboratoire (Boquet et al., 2000). Selon le modèle établi au laboratoire en 2004 (Isabel et al., 2004), la formation de la MLT bloque ou efface la MRA ; et il a été envisagé que de manière réciproque, la MRA pourrait être un verrou pour la formation de la MLT. Ainsi la perte de l'inhibition de la MRA pourrait faciliter la formation de MLT après un conditionnement massé, masquant le phénotype d'origine. Afin de minimiser les risques de formation de MLT, les différentes lignées homozygotes ont été testées 18 heures après un cycle unique de conditionnement, la MRA étant la seule mémoire normalement présente à ce temps. Un conditionnement avec un cycle unique permettait également d'éviter qu'un phénotype faible chez un mutant hypomorphe soit masqué par le surentraînement lié à un conditionnement massé. Le crible a été réalisé par Guillaume Azarias pendant son stage de Master.

Sur les 61 lignées d'origine, 9 présentent un défaut de mémoire significatif à 18 heures comparées au contrôle Canton-S (Cs) : *169Y*, *238Y*, *MZ918*, *171Y*, *C682a*, *GAL2489*, *C651*, *GAL2805*, *GAL3915* (**Fig. 21**). Les deux lignées *C596a* et *NP21* ont été conservées dans la suite du crible car elles présentaient un défaut de mémoire important bien que non significatif.

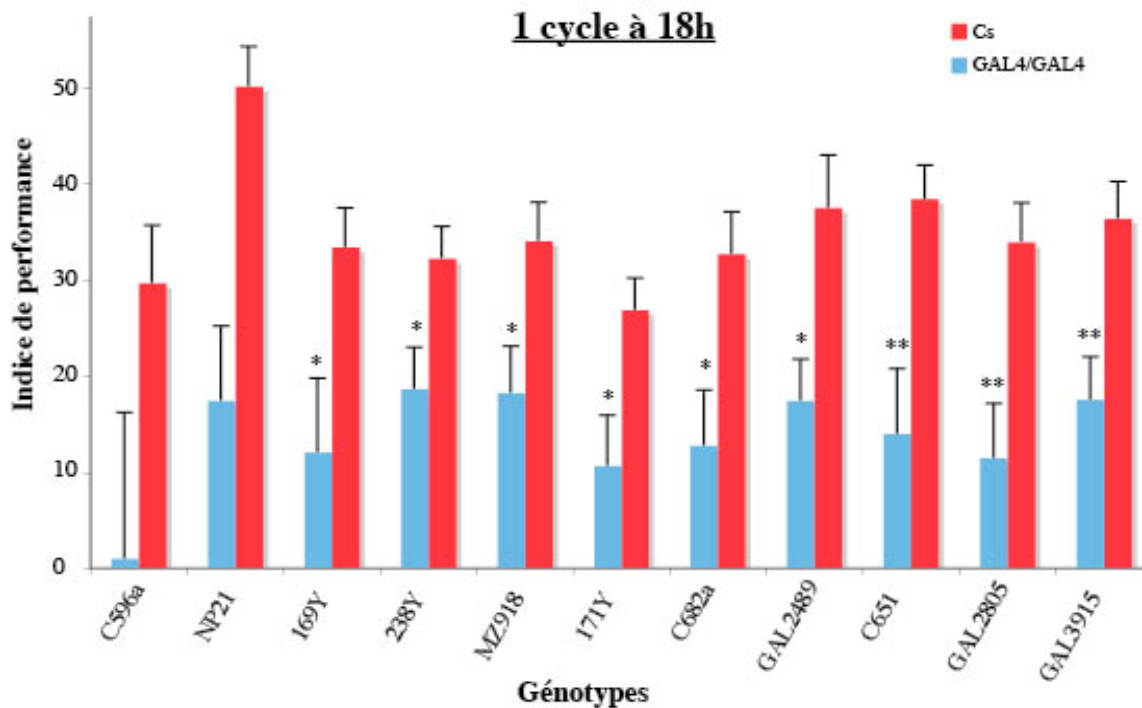


Figure 21 : « Résultat du crible de mutants de ARM.

Les indices de performance sont calculés à 18h après un le protocole court. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle Cs avec un test de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). $n=8$ pour tous les génotypes exceptés C596a ($n=3$) et GAL3915 ($n=16$).

Certaines lignées *GAL4* testées dans ce crible ont été générées depuis de nombreuses années ; ainsi d'autres mutations ont pu être sélectionnées et pourraient compenser partiellement le défaut de mémoire du mutant. Inversement, le défaut de mémoire pourrait ne pas être du à l'insertion de l'élément P mais à une mutation présente ailleurs dans le génome. Ces mutations peuvent avoir un impact important sur le comportement de la mouche et en particulier lorsque l'on étudie un mécanisme aussi complexe que la formation de la mémoire. Afin d'observer un phénotype qui ne dépende que de la présence de l'élément *GAL4* dans un gène, les différentes lignées ont été croisées à la lignée contrôle pendant cinq générations, dans le but d'homogénéiser leur fonds génétique par rapport à celui de la lignée Cs. Elles ont ensuite été rendues homozygotes puis testées à 18h après le protocole court.

Après homogénéisation du fonds génétique, 6 lignées sur les 11 criblées initialement présentent un défaut de mémoire à 18h: *GAL2805*, *C596a*, *GAL3915*, *GAL5122*, *171Y*, *GAL2489* (**Fig. 22**)

démontrant ainsi l'importance de ce fonds génétique. Par la suite, toutes les lignées testées dans cette étude ont un fonds génétique maintenu identique à celui du contrôle.

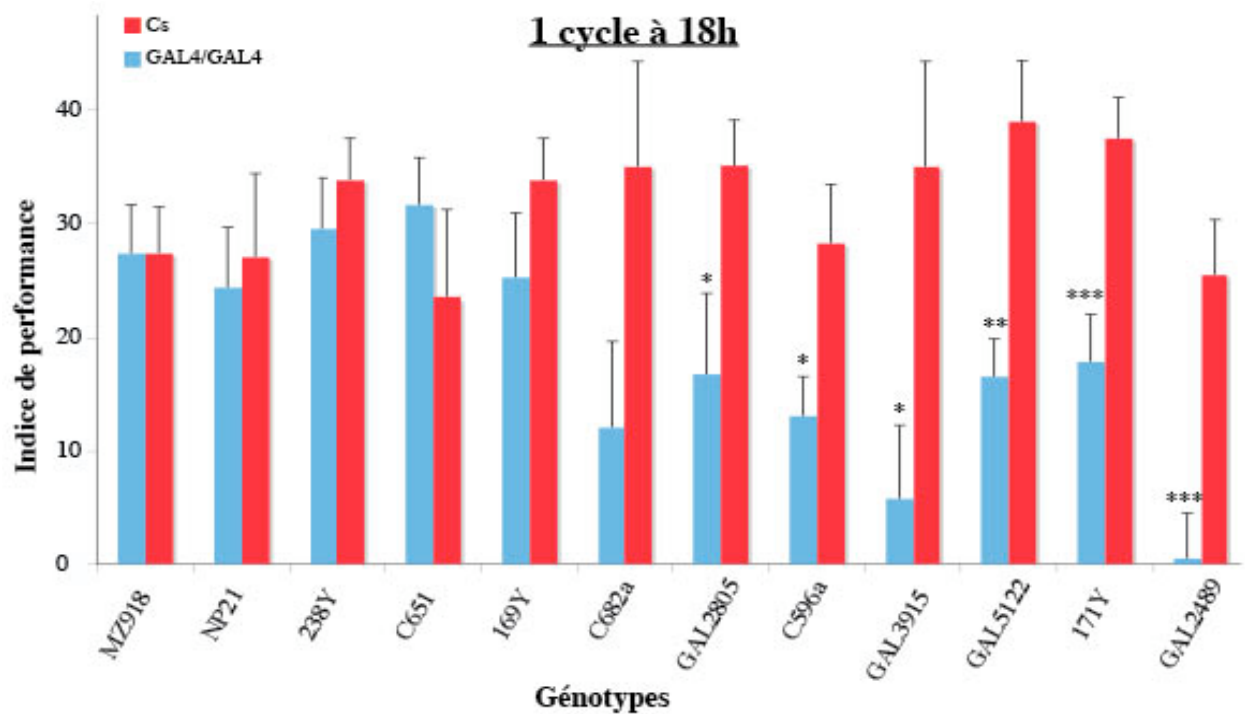


Figure 22 : Résultats du crible de mutants de ARM après homogénéisation du fonds génétique.

Les indices de performance sont calculés à 18h après un protocole court. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle Cs avec un test de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). $n \geq 8$ pour tous les génotypes.

Afin d'identifier les mutants spécifiques de la MRA, nous avons voulu vérifier que l'autre forme de mémoire consolidée, la MLT, était normale dans ces différentes lignées. Seules quatre souches présentent une MLT normale à 24 heures après un protocole long, *GAL2489*, *GAL2805*, *GAL5122* et *171Y* (Fig. 23).

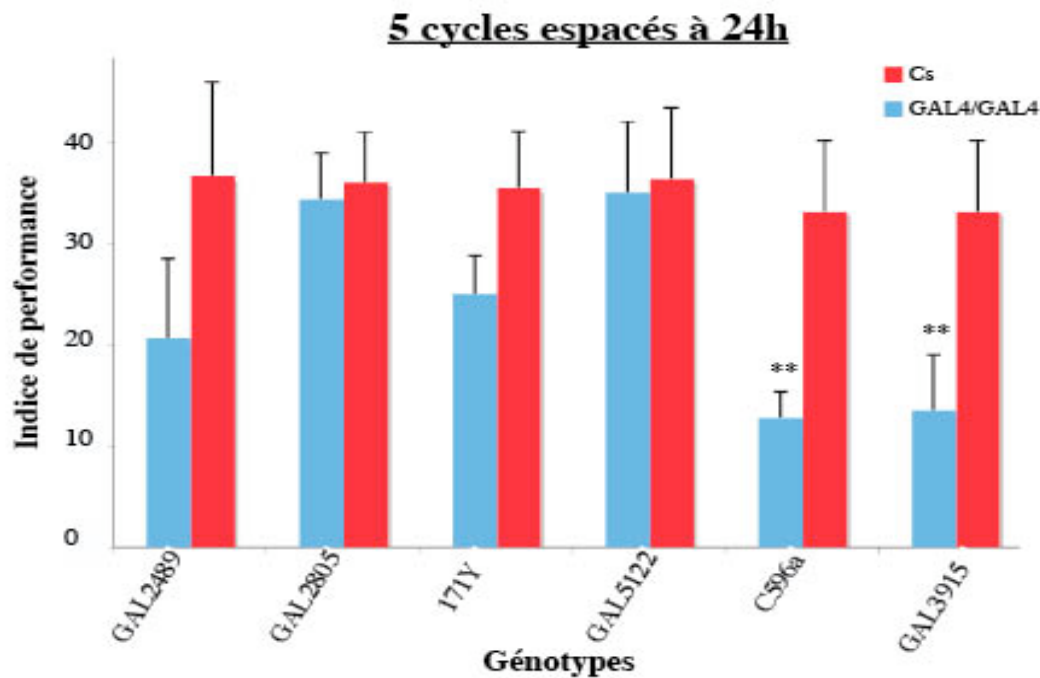


Figure 23 : Etude de la MLT des mutants identifiés lors du crible.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle Cs avec un test de Student (** $P < 0.01$). Aucune différence significative n'est décelée entre Cs et GAL2489 ($P = 0.53$), GAL2805 ($P = 0.87$), 171Y ($P = 0.14$) et GAL5122 ($P = 0.92$). $n \geq 12$ pour tous les génotypes.

Nous avons ensuite vérifié que les sens requis pour la formation d'une mémoire olfactive n'étaient pas affectés chez les différents mutants.

Les lignées *GAL5122*, *171Y* et *GAL2805* ne présentent pas de défaut d'olfaction (**Fig. 24**), ni de défaut de sensibilité aux chocs électriques (**Fig. 25**). Seule la lignée *GAL2489* présente un défaut d'olfaction à l'octanol (**Fig.24**).

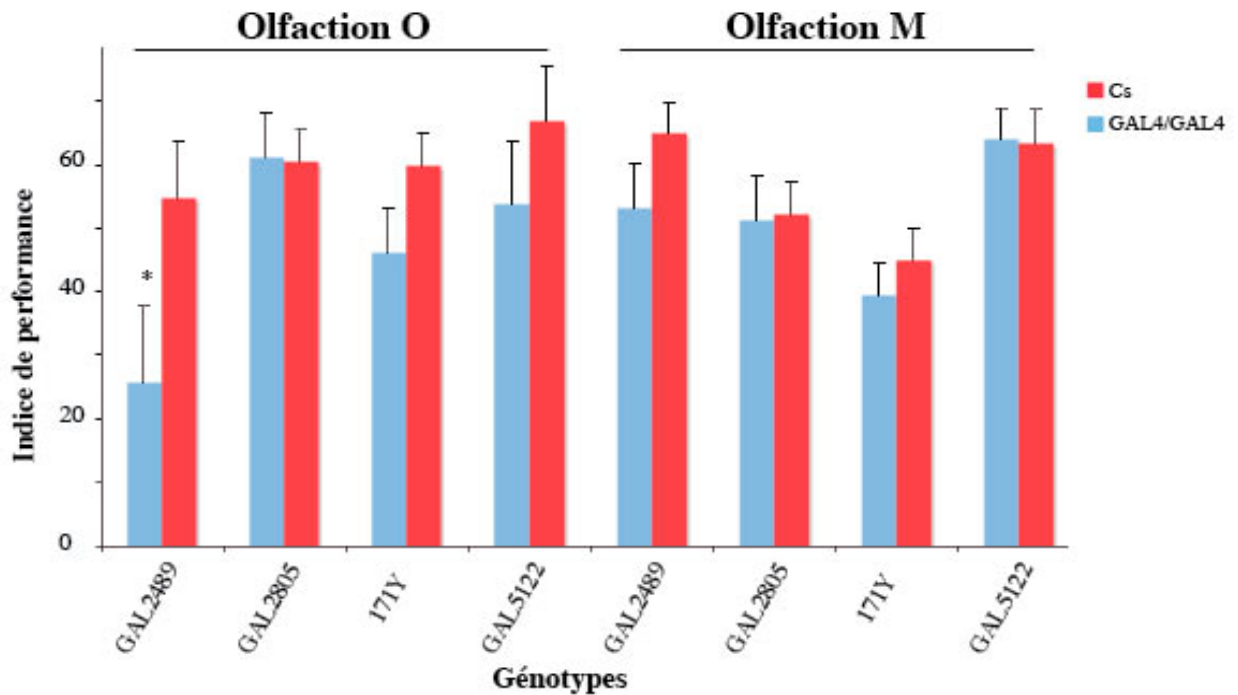


Figure 24 : Contrôle de l'olfaction des mutants identifiés lors du crible.

Les indices de performance sont calculés immédiatement après le conditionnement où l'odeur opposée est associée au choc. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle Cs avec un test de Student (* $P < 0.05$). $n \geq 10$ pour tous les génotypes.

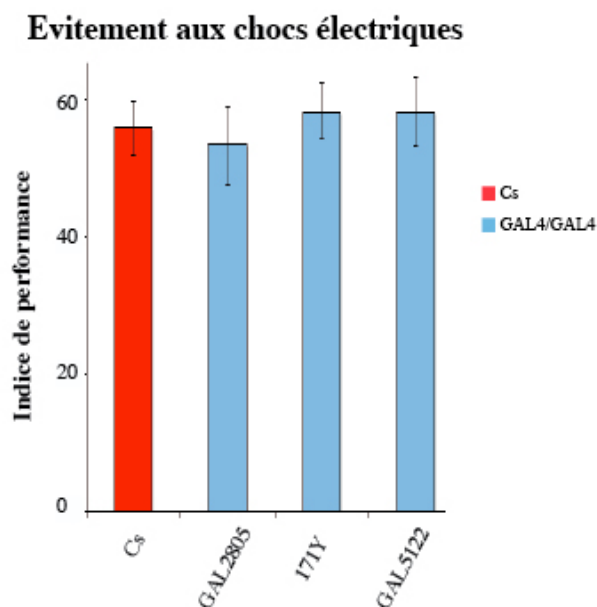


Figure 25 : Contrôle de l'évitement aux chocs électriques des mutants identifiés lors du crible.

Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student. $n \geq 12$ pour tous les génotypes.

Afin de vérifier que le défaut de mémoire observé après protocole court à 18h est bien un défaut de MRA, nous avons testé la performance mnésique de ces mutants après un protocole massé à 24 heures. Dans ces conditions, seule la lignée *GAL2805* présente un défaut de MRA (**Fig. 26**).

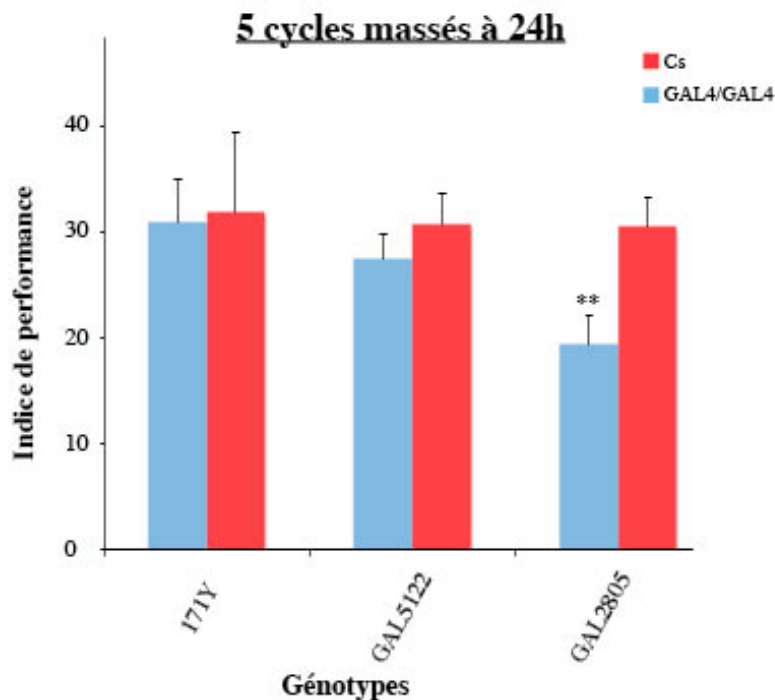


Figure 26 : Etude de la MRA chez les mutants identifiés lors du crible.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé. Une différence significative est détectée avec un test de Student entre Cs et GAL2805 ($P < 0.01$). $n \geq 12$

Le reste de l'étude a consisté en la caractérisation du mutant *GAL2805*, le seul à présenter un défaut de MRA à 24 heures après un conditionnement massé. Néanmoins, pour des raisons potentielles de compensation du phénotype du défaut de MRA, il serait intéressant de poursuivre l'étude des mutants *171Y* et *GAL5122*, et notamment de vérifier si la mémoire observée après un conditionnement massé est effectivement de la MRA ou bien de la MLT qui se formerait car la MRA ne jouerait plus son effet d'inhibition, notamment à l'aide d'un inhibiteur de synthèse protéique comme la CXM.

1.2 Article I : *Megad* gates long-term Memory formation in *Drosophila*

Cet article correspond à une partie de mon travail de thèse et est en cours de soumission au journal *Science*.

Résumé : Nous avons caractérisé un nouveau mutant de mémoire, *memory-gating defective* (*megad*) qui présente une MRA réduite mais une MLT normale. Nous avons montré que la MRA est effacée lors de la formation de la MLT et que la formation de MLT est facilitée lorsque la MRA est réduite. Ces résultats suggèrent que la MRA serait un verrou la formation de la MLT.

Megad gates long-term memory formation in *Drosophila*

Guillaume Isabel^{1*}, Julien Séjourné^{1*}, Séverine Trannoy¹, Guillaume Azarias¹, Paul Tchénio^{1,2} and Thomas Preat¹

¹Genes and Dynamics of Memory Systems, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

²Nanospectroscopy, Université Paris-Sud, CNRS UPR3321, Bâtiment 505 Campus Orsay, 91400 Orsay, France

Contact

Correspondence should be addressed to T.P. (thomas.preat@espci.fr).

Additional footnotes

* These authors contributed equally to the work.

Running title

Gating long-term memory

Abstract

Olfactory learning and memory studies have recently benefited from multidisciplinary researches, but the global picture of memory phases dynamics remains partially unclear. In *Drosophila* the reason why it exists two forms of consolidated memory, anesthesia-resistant memory (ARM) and long-term memory (LTM), is still unknown, and the link between those two phases is a matter of intensive debate. To address these issues we have characterized a new memory mutant, *memory-gating-defective (megad)*, that shows a reduced ARM but a normal LTM. We show that ARM is abolished during LTM formation, and conversely that LTM formation is facilitated when ARM is weakened. These results suggest that in wild-type flies ARM gates LTM formation.

Memory phases are temporally discrete components of the memory trace that are sustained by specific behavioral, anatomical and biochemical features. Memory phases can be independent of each other and operate in parallel, or on the contrary interact synergically for example when a short-term memory trace is consolidated into a long-lasting phase (1, 2). Understanding memory dynamics and, in particular, the mechanisms that gate long-term memory (LTM) formation is a key issue in neurosciences. Thus the brain must ensure that only the most relevant information is stored into long-lasting memory, notably because LTM formation is a costly process (3) that relies on *de novo* protein synthesis and formation of new synapses (4).

Drosophila molecular genetics provides a powerful approach to tackle these issues. We use different conditioning protocols during which groups of flies learn to associate an odor with electric shocks. A single conditioning cycle (short protocol) induces the formation of short-term memory (STM) and middle-term memory (MTM), that are both sensitive to cold anesthesia (5). The short protocol also induces the formation of consolidated anesthesia-resistant memory (ARM), that appears within 15 min after conditioning (6, 7). STM/MTM and ARM are also formed after intensive massed conditioning, that consists in several cycles of stimuli presentation without rest interval. High levels of ARM can be detected several days after massed conditioning when flies are tested in groups, but not when they are tested alone (8). The other consolidated memory, LTM, forms after intensive conditioning with a rest interval between training sessions (spaced conditioning). LTM but not ARM is affected by protein-synthesis inhibition using the cycloheximide

(CXM) blocker (7, 9). The mushroom bodies (MB), a symmetrical structure made of about 5000 neurons (10), has been extensively involved in all olfactory memory phases (11-13).

At the molecular level, the cAMP/PKA pathway plays a key role in STM/MTM but also in LTM formation (14). This sharing of molecular pathway outlines the need for mechanisms that gate LTM formation, depending on the relevance of the learned event. Many genes involved in LTM have been identified in *Drosophila* (11, 12), but surprisingly very few players of the ARM pathway have been described. Thus *radish* (*rsh*) is the only reported mutant that shows a specifically decreased ARM (5). *Rsh* encodes a protein of unknown function preferentially expressed in the MB (15). In addition, it was shown recently that ARM level is increased in mutant flies with reduced PKA activity (16). If connections between STM/MTM and LTM have been established (17, 18), the nature of the links between ARM and the other memory phases is still a matter of debate. Two models have been proposed to explain the relationship between ARM and LTM. In the first, both forms of memory coexist after spaced conditioning (7, 19). In the second model, we proposed that ARM and LTM are exclusive so that only LTM is expressed after spaced conditioning (20). However, we could not explain why those two consolidated phases were exclusive, and our model is still controversial. Thus the global scheme of memory phases dynamics in *Drosophila* remains unsolved, and identification of new genes involved in ARM formation and/or consolidation is essential not only to gain insight into this particular memory phase, but more generally to assess the links between ARM and LTM. To address these issues we isolated a new ARM mutant and reanalyzed the phenotype of several LTM mutants. We show that ARM is erased or blocked after spaced conditioning. Furthermore, our data indicate that LTM formation is facilitated in an ARM mutant, suggesting that ARM normally gates LTM formation.

With the aim of identifying new genes involved in ARM formation we recovered 61 enhancer-trap *P(Gal4)* lines showing preferential MB expression (data not shown). Homozygous *P(Gal4)* lines were trained with the short protocol and tested at 18 h after conditioning, a time point where ARM but not STM is thought to be present (5). The *Gal2805* line showed a decreased memory performance (Fig. S1A). The gene adjacent to *Gal2805* P-element was identified as being CG8034 (Fig. S2), which we named *memory-gating-defective* (*megad*). *Megad* is located on the X chromosome, and it encodes a 647 amino-acids putative monocarboxylic acid transporter (Fig. S2). In rodents, monocarboxylic acid transporters have been shown to transport energy metabolites like lactate and pyruvate (21). In particular MCT2, a *Megad* homolog, is expressed in post-synaptic-terminals, and it was suggested that lactate transfer by MCT2 is required to fuel axons for action potential propagation (22).

The *megad*^{Gal2805} enhancer-trap line displayed a strong expression in alpha/beta neurons of the MB, and a weaker one in alpha'/beta' and gamma neurons (Fig. S2). We analyzed the brain structure of *megad*^{Gal2805} flies using paraffin section and an anti-Fasciclin II antibody that labels the alpha/beta and gamma neurons. No defect was observed in the MB at this level of resolution (data not shown), but the possibility remained that subtle developmental defects existed that indirectly induced *megad*^{Gal2805} flies behavioral deficit. To rule out this hypothesis we used the RU486 inducible MB-Switch/RNAi system that allows decreasing the expression of a given gene in the adult alpha/beta and gamma MB neurons (23, 24). We recovered a *megad* RNAi line that showed no off-target. To study the RNAi efficiency an anti-Megad polyclonal antibody was raised that recognizes in brain extracts a 72 kDA band that fits with the 70 kDA Megad theoretical expected size (Fig. S2D). Western-blot analyses revealed that Megad expression was indeed decreased in both *megad*^{Gal2805} and *da-Gal4/RNAi megad* mutants (Fig. S2D), confirming that *megad*^{Gal2805} P-element affects *megad* expression and that the RNAi construct targets *megad* mRNA. Before further analyzing *megad* memory defects, we checked that *megad*^{Gal2805} and *MB-Sw/RNAi* mutants displayed normal olfactory acuity and shock reactivity (Fig. S1B-E).

Expression of *megad* RNAi in the adult MBs led to a decreased 3 h memory after the short protocol (Fig. 1A). Interestingly, *megad* RNAi mutant also showed a decreased 3 h memory score after cold-shock treatment in comparison with its genotypic controls, indicating that ARM was affected when *megad* expression was reduced in the adult MB (Fig. 1A). Moreover, the performance drop was similar in cold-shocked and untreated *megad* RNAi flies (Fig.1), indicating that ARM but not STM/MTM is affected in this mutant. To further analyze how *megad* RNAi affected ARM, the mutant was trained with the massed protocol. *MB-Sw/RNAi* flies fed with RU486 showed a decreased 24 h memory scored after massed conditioning (Fig.1B), while control *MB-Sw/RNAi* flies unfed with RU486 showed a normal memory (Fig.1B). Similarly, *megad*^{Gal2805} flies showed a significant 24 h defect after massed conditioning (Fig. S1F). Together, these results show that *megad* played a physiological role for the ARM pathway in the adult MBs. We have previously shown that the ARM pathway forms independently of the STM/MTM Rutabaga-cAMP-dependent pathway (20). To address the question of whether *megad* played an early or late role in the ARM pathway *MB-Sw/RNAi* flies were trained with the short protocol and tested immediately after training. The mutant showed a significant deficit (Fig. 1C). We conclude that *megad* is involved in an early step of the ARM pathway.

To scrutinize the link between ARM and LTM, *megad* mutants were trained with the spaced protocol and their memory tested at 24 h. *MB-Sw/RNAi* flies fed with RU486 showed a normal performance, suggesting that LTM was not affected in *megad* (Fig.2A). To prove that it was indeed

LTM that was formed in *megad* mutants one had to show that this memory was sensitive to protein-synthesis inhibition. However, it turned out that the protocols used to feed flies with RU486 and CXM were not compatible (data not shown). Moreover, one can anticipate that blocking protein synthesis might affect the machinery required for proper RNAi action, thus masking the mutant phenotype due to *megad* RNAi expression. To solve that issue we analyzed *megad*^{Gal2805} flies that showed a constitutive ARM defect (Fig. S1F). After spaced conditioning *megad*^{Gal2805} flies showed a normal memory performance (Fig. 2B), as did *MB-Sw/RNAi* flies. Interestingly, *megad*^{Gal2805} performance after spaced conditioning was decreased by CXM treatment (Fig. 2C), demonstrating that this memory corresponded to LTM.

These results strongly suggest that ARM is not present after spaced conditioning. However, this conclusion contradicted a previous report showing that the ARM mutant *rsh*¹ has a decreased memory performance at 24 h after spaced conditioning but a normal memory at 48 h, a result that led to conclude that ARM was present at 24 h after spaced conditioning (7). We tried to solve out this discrepancy and reanalyzed *rsh*¹ mutant memory phenotype. To control the background of the chemically-induced *rsh*¹ mutant we outcrossed the original mutation to place it in a fresh CS background (see Material and Methods in the Supplementary section). This step was important to rule out the possibility that the *rsh*¹ defect observed at 24 h after spaced conditioning was due to a background defect, unrelated to *rsh*¹ point mutation. As expected, freshly outcrossed *rsh*¹(CS) flies showed a clear 24 h memory deficit after massed conditioning (Fig. S3A). Surprisingly however, *rsh*¹(CS) flies also showed a very weak performance after spaced conditioning (Fig. S3B). These results are not compatible with the idea that *rsh*¹(CS) flies have a normal LTM, and they rather suggest that the *rsh*¹ mutation has a pleiotropic effect affecting both ARM and LTM. The aversive LTM defect of *rsh*¹ mutant might have been previously undetected because of a background issue.

Up to now the data presented here suggest that ARM is either erased or blocked after spaced conditioning. However, a major argument is regularly put forward to sustain the idea that normal ARM is present after spaced conditioning: most conditions that affect LTM lead to only a partial reduction of 24 h memory performance after spaced conditioning as remains a memory that reaches a level similar to that obtained after massed conditioning in wild-type flies (25). Thus, many LTM mutants display after spaced conditioning 24 h memory scores that are about half of that of the wild-type strain (23, 26-28). Similarly, inhibition of protein synthesis with CXM after spaced conditioning decreases the memory performance of wild-type flies to a level close to that observed after massed conditioning (7). Those data are usually interpreted as if LTM was strongly reduced in LTM mutants and in wild-type flies treated with CXM (25), while ARM was normal. However an alternative hypothesis is that the remaining memory observed in flies with abnormal LTM

corresponded to residual LTM, while ARM was absent after spaced conditioning (20). Thus, it is conceivable that most of the conditions that affect LTM only reduce it partially because the underlying LTM molecular and cellular mechanisms are not fully blocked. This alternative view is sustained by the observation that usual CXM conditions only decrease *Drosophila* protein synthesis by half (7), and by the fact that most mutations that affect LTM are not null alleles that would completely abolish the gene function (23, 27). Moreover, the view that ARM is not present after spaced conditioning is in agreement with a previous work showing that the anatomical mutant *alpha-lobes-absent* (*ala*) has a score close to zero after spaced conditioning, and a normal ARM score after massed conditioning (20). However, this previous work was based on the observation of *ala* flies with no MB vertical lobes, and therefore one could not rule out that the observed memory dynamics was specific to that particular brain anatomy.

To address the issue of the *quality* of the memory generated after spaced conditioning, we combined different conditions that affect LTM, namely a CXM treatment and *crammer* (*cer*) or *tequila* (*teq*) LTM mutation (23, 27). If the memory observed after spaced conditioning in CXM treated flies corresponds to ARM, it should not be further affected by LTM-specific mutations. Similarly, the memory observed after spaced conditioning in *cer^P* and *teq^P* mutants should not be affected by CXM treatment if it corresponds to ARM. Interestingly, *cer^P* and *teq^P* flies treated with CXM showed performances significantly lower than both untreated *cer^P* and *teq^P* mutants and CXM-treated wild-type flies (Fig. 3). We note that in the case of *teq^P* flies fed with CXM, the 24 h memory performance was fully abolished after spaced conditioning. As a control we checked that both *cer^P* and *teq^P* mutants fed with CXM had a normal performance after massed conditioning (Fig. S4). Thus, after spaced conditioning in CXM treated wild-type flies or in untreated *cer^P* and *teq^P* mutants, the quality of the memory that remains is LTM and not ARM. Those data indicate that ARM is present after the short protocol or after massed conditioning, but is blocked or erased after spaced conditioning. The fact that ARM inhibition occurred in spaced-trained flies treated with CXM suggests that this inhibition does not rely on *de novo* protein synthesis, and that it takes place early on during LTM formation, before the onset of protein-synthesis dependent events.

What is the significance of the exclusivity between ARM and LTM? Why is ARM formed early on after a single training cycle to disappear after multiple spaced conditioning? We hypothesized that ARM may act as a gating mechanism that prevented LTM formation in absence of intensive spaced conditioning (20). The characterization of *megad*, a mutant that specifically affects the ARM-pathway, provided an opportunity to challenge the hypothesis that, in reduced ARM condition, LTM formation should be facilitated. In wild-type flies LTM is formed after five spaced

training cycles but not after three cycles (Fig.4A). Interestingly, LTM formation was facilitated in the *megad* mutant as LTM was already formed after three spaced conditioning cycles (Fig. 4A).

Why are there two forms of consolidated memories in *Drosophila* and how do they interact? Our results indicate that LTM formation, which requires *de novo* protein synthesis (2, 7) is linked to the blocking or erasure of the other form of consolidated memory, ARM. Furthermore we showed that a decreased ARM facilitates LTM formation, strongly suggesting that in normal flies ARM acts as a gating mechanism that ensures that LTM cannot be formed after a single conditioning cycle (or a few spaced cycles) (Fig. 4B). The process that governs ARM erasure or blocking might be initiated during the intertrial intervals that characterize spaced conditioning. ARM retrieval involves alpha/beta neurons (20), and enhancer-trap expression data suggest that *megad* is preferentially expressed in alpha/beta neurons (Fig. S2C). Since these neurons are also involved in LTM (18, 20, 29), the antagonism between ARM and LTM may take place within the same cells and involve opposite biochemical pathways.

Material and methods

Stocks

Drosophila melanogaster wild-type strain Canton-Special (CS) and mutant flies were raised at 18°C, 60% humidity in a 12:12 h light:dark cycle. All strains used for memory experiments were outcrossed to flies with the CS background. The *megad* RNAi line (8034R-1) was obtained from the National Institute of Genetics (Shizuoka, Japan). The corresponding shows no off-target, i.e. no other 18-mer hit without mismatch.

Olfactory conditioning

Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as previously described (29), except that five cycles were used for intensive conditionings instead of ten. Conditionings were performed on samples of 30-40 flies aged between 2 and 3 days.

Memory tests

Tests were performed with a T-maze apparatus (30). Flies were allowed to distribute for one minute between two arms delivering octanol vs. methylcyclohexanol odorant. An index was calculated as the difference between the number of flies in each arm, divided by the sum of flies in both arms. Two indexes were calculated from two reciprocal experiments and were averaged to give a memory score.

Olfactory acuity

Decreased odor avoidance (OA) after electric shock can bias learning and memory tests (31). For OA tests, flies were treated in the barrel as for the associative conditioning, except that presentation of the second odor was omitted and replaced by exposure to air. For OA testing, treated animals were transported to the choice point of the T maze immediately after training and allowed to choose between the second odor and air (31).

Shock sensitivity

Two barrels, identical to that normally used for conditioning, were connected to each other by a Plexiglas dish. Flies were trapped in the center of the compartment and allowed to distribute for one minute in the two barrels, one of which being electrified with pulses of 60V DC identical to that normally used for conditioning.

Gene-switch experiments

The Gene-switch inducible system was used as described by Mao and collaborators (2004) (24). For RU486 administration, an appropriate amount of a 10 mM RU486 stock solution was mixed into molten food at 65°C to a final concentration of 200 µM. The food was poured in empty bottles and allowed to solidify. Before training, flies were kept during two days at 25°C on food with the drug before conditioning. After training flies were kept until the test at 18°C on a freshly made RU486 added medium.

Cycloheximide treatment

We modified a protocol from Yu et al. (2006) (18). After 1 day on fresh medium, flies were transferred into 15 ml Falcon tubes containing a Whatman filter paper (1x2.5 cm) soaked with 125 µl of 35 mM CXM solution (94% purity; Sigma) diluted in mineral water (Evian®, pH=7.2) or with mineral water alone (control), for 16-18 h. Flies were then transferred into regular starvation bottles for 1 h before being conditioned, and transferred back into those bottles afterwards.

Cold-shock treatment

Cold-shock was performed as Folkers et al. (1993) (5). One hour before the memory test, flies were transferred to 4°C-prechilled glass tubes for 2 min.

***rsh*¹ outcross**

To place the *rsh*¹ (5) mutation in the CS genetic background, we crossed *rsh*¹ females to CS males. As *rsh*¹ flies do not carry any visible marker, we performed blind crosses for two more generations with new born females and CS males. Then, we generated 32 independent stable lines by crossing a single new born male with females that carried the FM7C balancer in a CS background. This scheme eventually led us to establish 32 lines that had a theoretical 12.5% probability of being homozygous for an outcrossed *rsh*¹(CS) mutation. Genomic DNA was extracted from each line and a standard PCR was carried out with a Pfu polymerase (Stratagene) and the two primers CAGCCAGATCGCCGAGATCG and ACGAATCGCGTCTGCCACGA. PCR products were further sequenced (Eurofins, MWG operon). Among the 32 lines studied 4 carried the *rsh*¹ mutation. The remaining 28 lines showed a wild-type sequence. Flies from the four mutant lines were mixed to generate the freshly outcrossed *rsh*¹(CS) line that was used for behavioral experiments.

Western blot analysis

The polyclonal anti-Megad antibody was generated by injecting rabbits with a Megad peptide (Fig. S2A) coupled to Ovalbumine (PolyPeptide group). The polyclonal antibody was purified by affinity with the Megad peptide using ThermoScientific kit N° 44999. The Head proteins were isolated from 100 frozen animals and treated as described in (27). Standard western blot procedure was performed as described (32). Polyclonal antibodies against Megad was used at 1:10000 dilution, and monoclonal antibody against γ -Tubulin(Invitrogen) at 1:20000 dilution.

Plasmid rescue

Genomic fragment adjacent to the P-element insertion in *megad*^{gal2805} was isolated from XhoI-digested genomic DNA by plasmid rescue (33).

Data analysis

Scores were analyzed using Student's t-tests to compare two groups, or one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test if significant at P<0.05, to compare several groups. Scores indicated in the text are given as means \pm SEM.

Acknowledgements

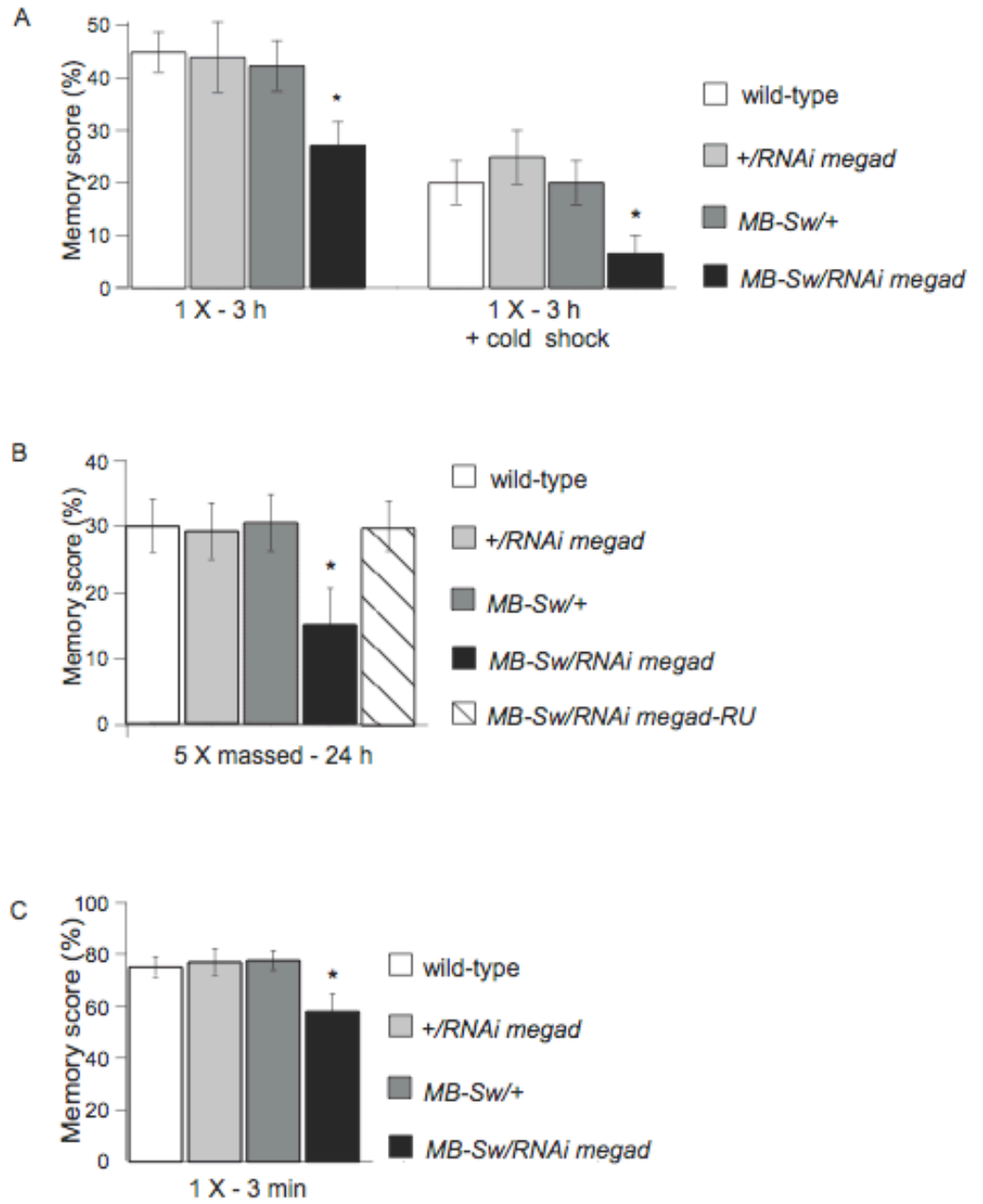
We thank Ryu Ueda for providing the *megad* RNAi line. We thank Vincent Hakim, Frédéric Méry, Alberto Pascual and members of our laboratory for helpful discussions. We thank Niki Scaplehorn for proof-reading the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche, the Fondation Bettencourt-Schueller and the Fondation pour la Recherche Médicale (to T.P.). G.I. and J.S. were supported by the Fondation pour la Recherche Médicale.

Competing interests statement: the authors declare no competing financial interests.

References

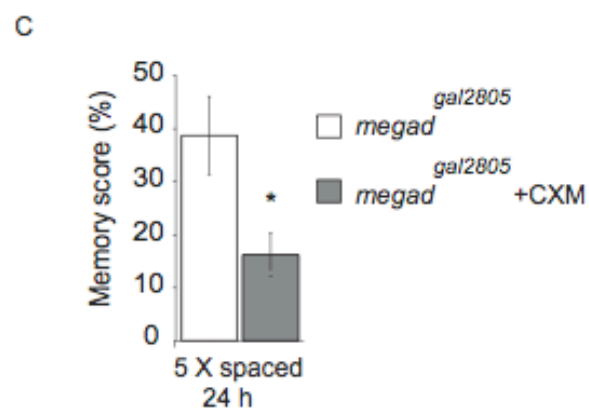
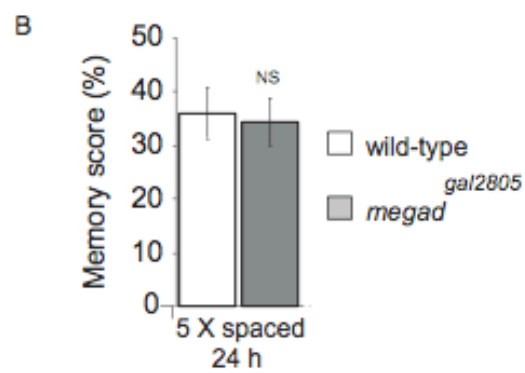
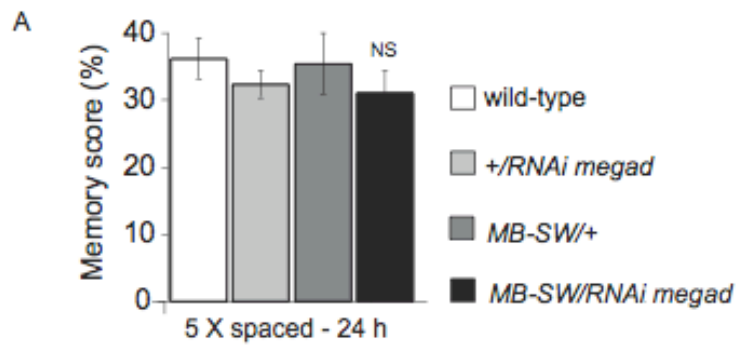
1. I. Izquierdo *et al.*, *Nature* **393**, 635 (Jun 18, 1998).
2. J. L. McGaugh, *Science* **287**, 248 (Jan 14, 2000).
3. F. Mery, T. J. Kawecki, *Science* **308**, 1148 (May 20, 2005).
4. H. Wang, Y. Hu, J. Z. Tsien, *Prog Neurobiol* **79**, 123 (Jun, 2006).
5. E. Folkers, P. Drain, W. G. Quinn, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8123 (Sep 1, 1993).
6. Y. Dudai, Y. N. Jan, D. Byers, W. G. Quinn, S. Benzer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1684 (May, 1976).
7. T. Tully, T. Preat, S. C. Boynton, M. Del Vecchio, *Cell* **79**, 35 (Oct 7, 1994).
8. M.-A. Chabaud, Isabel, G., Kaiser, L. and Preat, T., *Curr. Biol.* (*in press*).
9. E. Glassman, *Annu Rev Biochem* **38**, 605 (1969).
10. J. R. Crittenden, E. M. Skoulakis, K. A. Han, D. Kalderon, R. L. Davis, *Learn Mem* **5**, 38 (May-Jun, 1998).
11. R. L. Davis, *Annu Rev Neurosci* **28**, 275 (2005).
12. G. Isabel, Preat, T., *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, J.D. Sweatt, Ed. (Oxford: Elsevier, Oxford, 2008) **4**, 103 (2008).
13. M. Heisenberg, *Nat Rev Neurosci* **4**, 266 (Apr, 2003).
14. T. Abel, P. V. Nguyen, *Prog Brain Res* **169**, 97 (2008).
15. E. Folkers, S. Waddell, W. G. Quinn, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17496 (Nov 14, 2006).
16. J. Horiuchi, D. Yamazaki, S. Naganos, T. Aigaki, M. Saitoe, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20976 (Dec 30, 2008).

17. Y. Lu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13792 (Aug 21, 2007).
18. D. Yu, D. B. Akalal, R. L. Davis, *Neuron* **52**, 845 (Dec 7, 2006).
19. C. Margulies, T. Tully, J. Dubnau, *Curr Biol* **15**, R700 (Sep 6, 2005).
20. G. Isabel, A. Pascual, T. Preat, *Science* **304**, 1024 (May 14, 2004).
21. K. Pierre, L. Pellerin, *J Neurochem* **94**, 1 (Jul, 2005).
22. A. M. Brown, S. B. Tekkok, B. R. Ransom, *J Physiol* **549**, 501 (Jun 1, 2003).
23. G. Didelot *et al.*, *Science* **313**, 851 (Aug 11, 2006).
24. Z. Mao, G. Roman, L. Zong, R. L. Davis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 198 (Jan 6, 2004).
25. J. C. Yin *et al.*, *Cell* **79**, 49 (Oct 7, 1994).
26. J. Dubnau *et al.*, *Curr Biol* **13**, 286 (Feb 18, 2003).
27. D. Comas, F. Petit, T. Preat, *Nature* **430**, 460 (Jul 22, 2004).
28. H. Zhao *et al.*, *J Neurosci* **29**, 414 (Jan 14, 2009).
29. A. Pascual, T. Preat, *Science* **294**, 1115 (Nov 2, 2001).
30. T. Tully, W. G. Quinn, *J Comp Physiol A* **157**, 263 (Sep, 1985).
31. T. Preat, *J Neurosci* **18**, 8534 (Oct 15, 1998).
32. J. Sambrook, Fritsch, E.F., Maniatis, T., *A laboratory manual*, (1989).
33. C. Wilson *et al.*, *Genes Dev* **3**, 1301 (Sep, 1989).



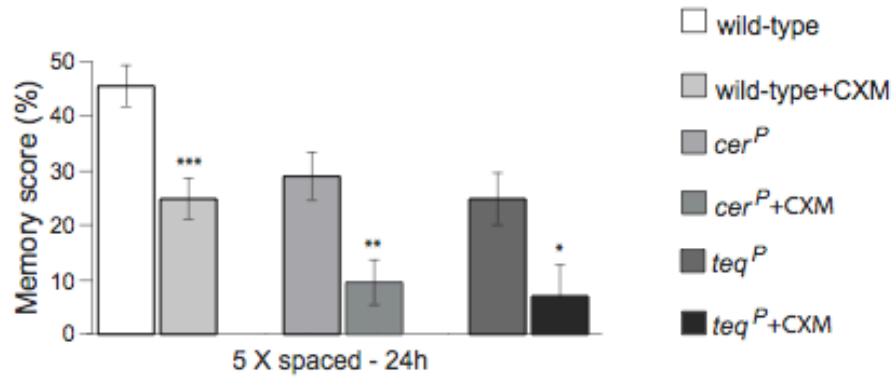
Isabel et al., Figure 1

Fig. 1. Identification of *memory-gating-defective (megad)*, a new mutant that affects the ARM pathway. All experiments were performed with flies fed with food supplemented with 200 μ M RU486 except for the "*MB-Sw/RNAi megad* (no RU)" group (hatched bar). (A) RNAi disruption of *megad* expression in adult MBs led to a three-hour memory defect after a single conditioning cycle (left graph). One-way ANOVA revealed a significant difference [$F(3,36)= 3.955, P<0.05, n=10$ per group]. Pairwise planned comparisons revealed that *MB-Sw/RNAi megad* is significantly different from wild-type ($P<0.05$) ; *+/RNAi megad* ($P<0.05$) and *MB-Sw/+* ($P<0.01$). This 3-hour memory drop persisted when flies were submitted to a 2-min cold shock 2 hours after conditioning (right graph). One-way ANOVA of memory scores revealed a significant difference [$F(3,28)= 5.296, P<0.01, n=8$ per group]. Pairwise planned comparisons revealed that *MB-Sw/RNAi megad* vs wild-type $P<0.05$; vs *+/RNAi megad* $P<0.01$; vs *MB-Sw/+* $P<0.01$) (right side of the graph). (B) Disruption of *megad* expression in adult MBs led to an ARM defect 24-hour after 5 massed cycles of conditioning. One-way ANOVA revealed a significant difference [$F(4,58)= 2.940, P<0.05, n\geq 13$ per group]. Pairwise planned comparisons revealed that *MB-Sw/RNAi megad* is significantly different from wild-type ($P<0.05$); *+/RNAi megad* ($P<0.05$); *MB-Sw/+* ($P<0.05$); *MB-Sw/RNAi megad* memory unfed with RU did not differ from other controls and were significantly different from *MB-Sw/RNAi megad* fed with RU ($P<0.05$). (C) Disruption of *megad* expression in adult MBs led to a 3-min memory defect after one cycle of conditioning. One-way ANOVA revealed a significant difference [$F(3,32)= 3.692, P<0.05, n=9$ per group]. Pairwise planned comparisons revealed that *MB-Sw/RNAi megad* is significantly different from wild-type ($P<0.05$) ; *+/RNAi megad* ($P<0.05$) ; *MB-Sw/+* ($P<0.05$).



Isabel et al., Figure 2

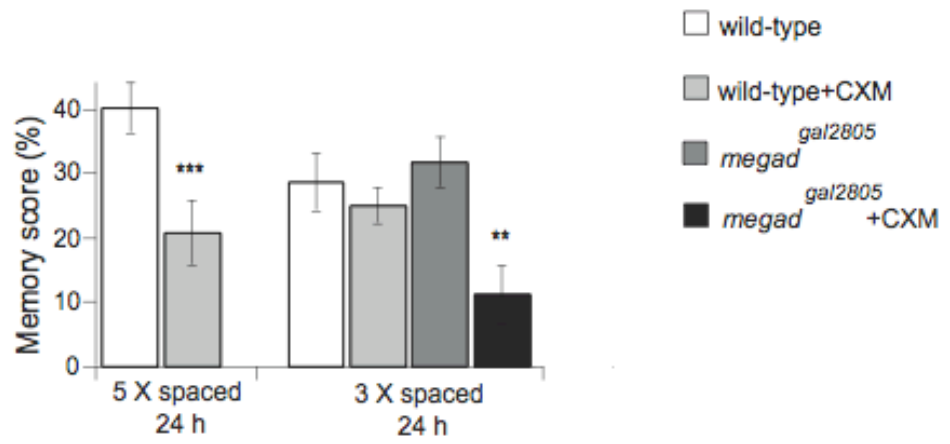
Fig. 2. Disruption of *megad* expression does not affect long-term memory. (A) Disruption of *megad* expression in adult MBs led to normal 24-hour memory after spaced conditioning. All experiments were performed with flies fed with food supplemented with 200 μ M RU486. One-way ANOVA revealed no significant difference [F(3,48)=0.4776, P=0.6994, n=13 per group]. (B) *megad*^{gal2805} displayed a normal 24-hour memory after spaced conditioning. Student's *t*-test revealed no significant difference between *megad*^{gal2805} and wild-type (P=0.81, n=15 per group). (C) LTM is formed in *megad*^{gal2805}. Student's *t*-test revealed a significant difference between *megad*^{gal2805} and *megad*^{gal2805} fed with CXM (P<0.05, n=8 per group).



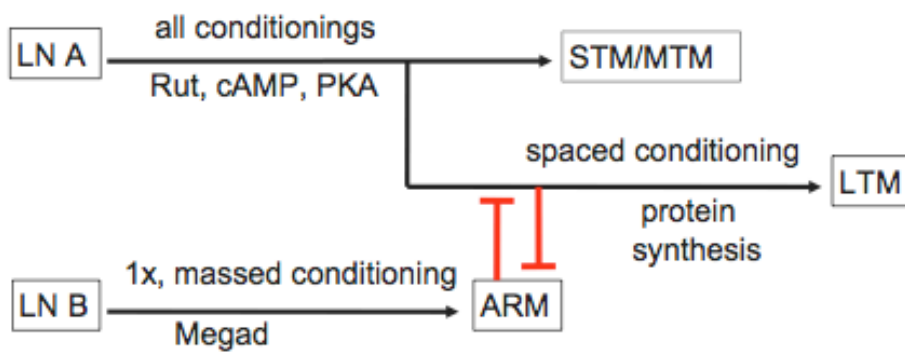
Isabel et al., Figure 3

Fig. 3. ARM is abolished after spaced conditioning. Specific long-term memory *cer^P* and *teq^P* mutants were fed with CXM and trained with 5 cycles of spaced conditioning. One-way ANOVA revealed a significant difference [F(5,118)=10.203, P<0.0001, n≥18 per group]. Pairwise planned comparisons revealed that the difference between wild-type vs wild-type + CXM is significant (P<0.01), *cer^P* vs *cer^P* fed with CXM is significantly lower (P<0.05), *teq^P* and *teq^P* fed with CXM perform a memory significantly lower (P<0.05). Memory performances of LTM mutants fed with CXM are significantly lower than that of wild-type flies fed with CXM : wild-type + CXM vs *cer^P* + CXM (p<0.05), wild-type + CXM vs *teq^P* +CXM (p<0.05).

A



B



Isabel et al., Figure 4

Fig. 4. LTM formation is facilitated in *megad*^{gal2805} ARM mutant. (A) After 5 cycles of spaced conditioning, LTM was lower in wild-type flies fed with CXM compared to untreated wild-type flies as expected (t-test $p < 0.001$, $n = 12$). After 3 cycles of spaced conditioning *megad*^{gal2805} flies fed CXM showed a lower 24-hour memory than untreated *megad*^{gal2805} flies (T-test, $P < 0.01$, $n = 12$). After 3 cycles of spaced conditioning the performance of wild-type flies fed with CXM was CXM-insensitive ($P = 0.49$, $n \geq 15$ groups). (B) Representation of aversive olfactory memory phases in *Drosophila*. ARM prevents LTM formation after a single conditioning cycle or after massed conditioning. After intensive spaced conditioning ARM is erased (or blocked), allowing LTM to form. LTM formation depends on *de novo* protein synthesis, but not ARM erasal (or blocking).

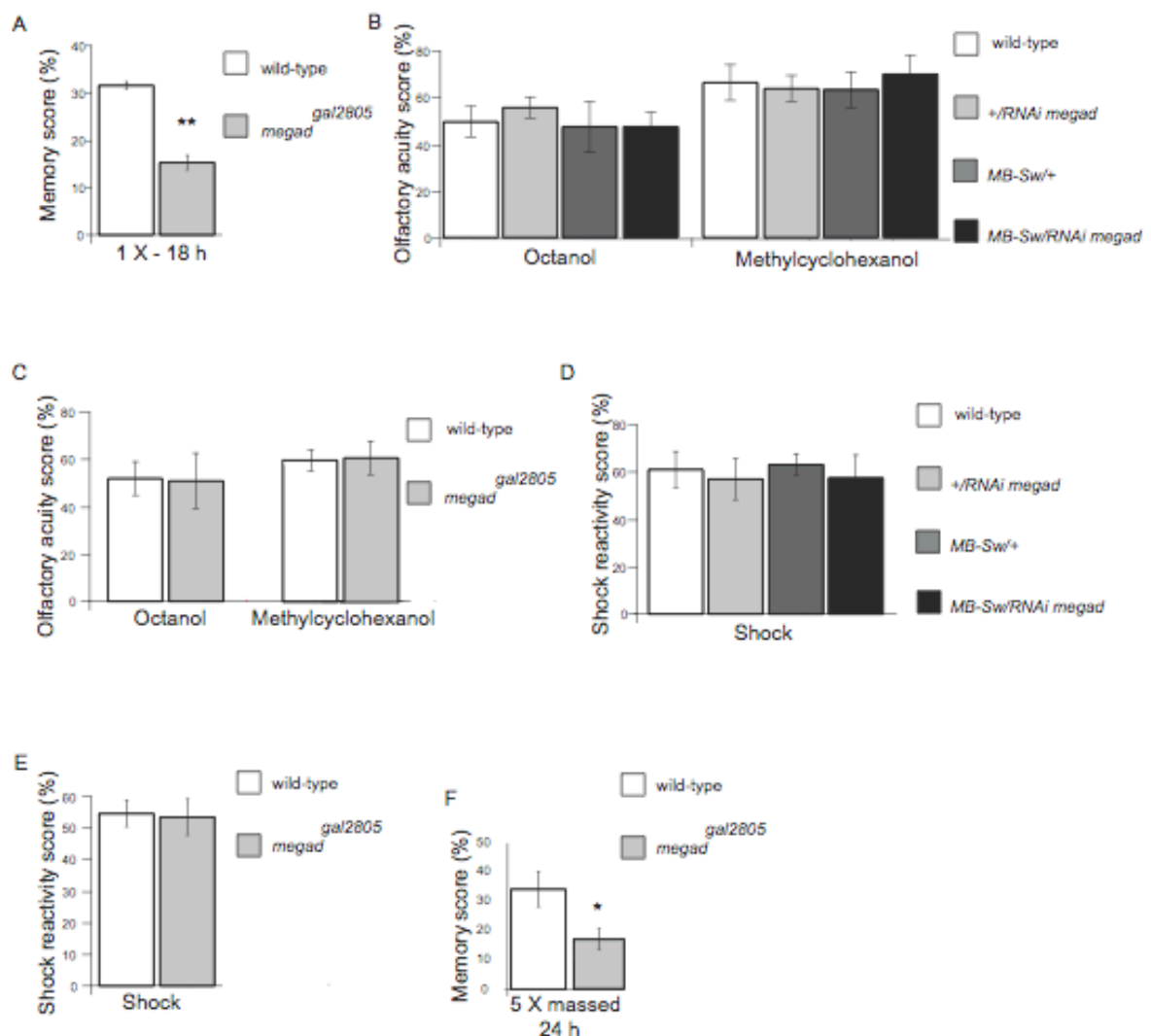


Fig. S1. Megad mutants are impaired for ARM but not for olfactory acuity or electric shock reactivity. (A) *megad^{gal2805}* line showed a 18 h memory defect after a single conditioning (*t*-test comparison with wild-type $P < 0.01$, $n = 23$ per group). (B) Disruption of *megad* expression in adult MBs did not affect olfactory acuity. One-way ANOVA revealed no significant difference between genotypes for octanol [$F(3,28) = 0.1524$, $P = 0.9273$, $n = 8$ per group] or for methylcyclohexanol [$F(3,28) = 0.2903$, $P = 0.832$, $n = 8$ per group]. (C) *megad^{gal2805}* line showed a wild-type olfactory acuity (*t*-test, *megad^{gal2805}* vs wild-type $P = 0.92$, $n = 9$ per group for octanol; *megad^{gal2805}* vs wild-type $P = 0.94$, $n = 9$ per group for methylcyclohexanol). (D) Disruption of *megad* expression in adult MBs did not affect electric shock sensitivity. One-way ANOVA revealed no significant difference [$F(3,20) = 0.2318$, $P = 0.8731$, $n = 8$ per group]. (E) *megad^{gal2805}* line showed a wild-type electric shock avoidance by one-way ANOVA (*t*-test, $P = 0.84$, $n = 12$ per group). (F) *megad^{gal2805}* flies showed a decreased 24 h ARM performance after 5 cycles of massed conditioning (*t*-test, $P < 0.05$, $n = 15$ per group).

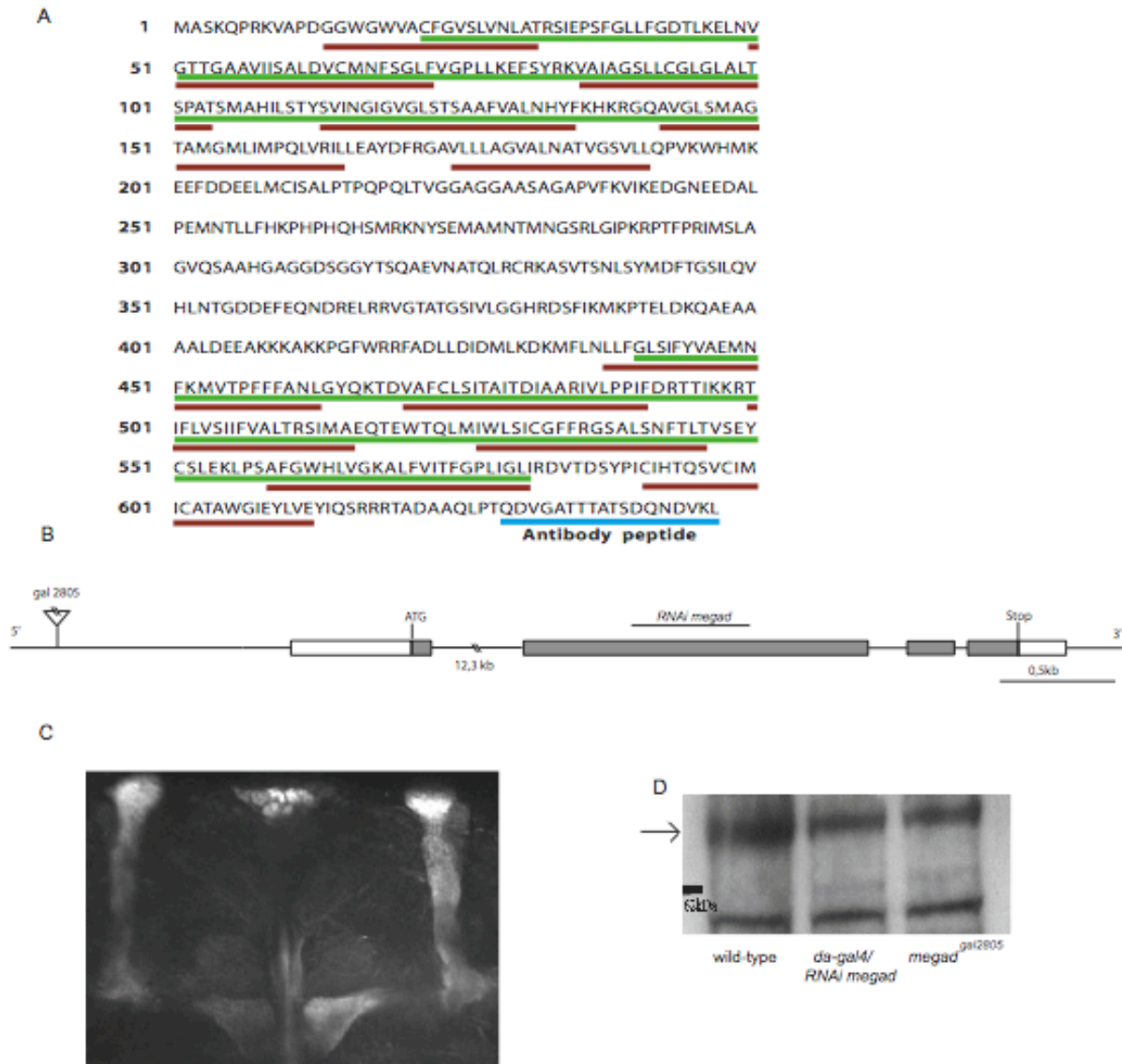


Fig. S2 Megad molecular data. A) Megad protein sequence. The 12 putative transmembrane domains are outlined in brown. The two Major Facilitator Superfamily (MFS) domains are outlined in green. The anti-Megad antibody was directed against the 18 amino-acids C-terminal sequence of the protein (outlined in blue). B) Representation of *megad* genomic DNA region. Grey boxes: genomic DNA that corresponds to mRNA coding sequences; white boxes: genomic DNA that corresponds to untranslated mRNA sequences. The Gal4 pGawB-element in *megad*^{Gal2805} is inserted 951 bp upstream the transcription start. The *megad* RNAi is directed against part of the second exon. C) Confocal image of a *megad*^{Gal2805}/*UAS-cd8-GFP* central brain. GFP is preferentially accumulated in alpha/beta neurons of the MBs and *pars intercerebralis*. Signal is also detected in the alpha'/beta' and gamma lobes. D) Western blot analysis revealed a decrease of Megad protein (arrow) in *da-gal4/RNAi megad* and *megad*^{Gal2805} compared to the wild-type. The lower band is a non-specific protein recognized by the antibody and serves as a loading control.

Isabel et al., Figures S2

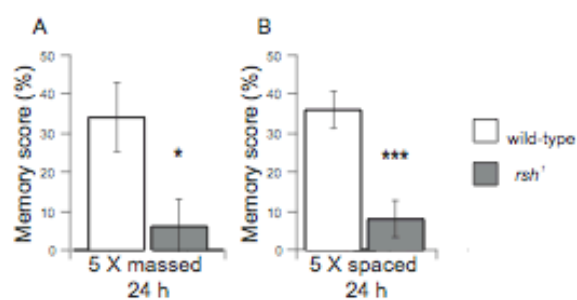


Fig. S3. Anesthesia-resistant memory and long-term memory are impaired in outcrossed *radish*¹ line. A) *Rsh*¹(CS) memory was significantly lower than wild-type 24 hours after 5 cycles of massed conditioning (*t* test, $P < 0.05$, $n = 10$ per group). B) *Rsh*¹(CS) memory was lower than wild-type 24 hours after 5 cycles of spaced conditioning (*t*-test, $P < 0.001$, $n = 10$ per group).

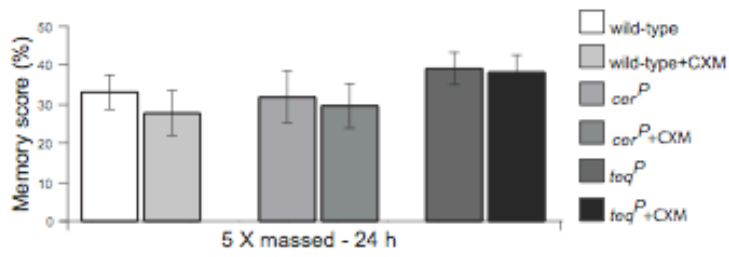


Fig. S4. Anesthesia-resistant memory in wild-type and LTM mutants is CXM insensitive. 24 h memory after massed conditioning. One-way ANOVA of memory scores revealed no significant difference [$F(5,42)=0.4259$; $P=0,828$, $n=8$ per group].

1.3 Données supplémentaires

1.3.1 Les lignées NP2310 et E02338 affectant *megad* présentent des défauts de MRA et de MLT

Le clonage par « plasmid rescue » a permis de déterminer que c'est le gène *megad* (*memory-gating-defective* ou *CG8034*) qui est affecté dans le mutant *GAL2805*. D'autres éléments P sont insérés à proximité ou dans le gène *megad*, conduisant potentiellement à une dérégulation du gène. Dans la lignée *NP2310*, un élément P-GawB est inséré dans les séquences régulatrices de *megad*, 300 paires de bases (pb) en amont du premier exon. Dans la lignée *E02338*, l'élément P-BAC(RB) est inséré dans le premier intron, 8,5 kilobases (kb) en aval de la fin du premier exon.

Afin de déterminer si ces deux insertions donnaient un phénotype similaire à celui obtenu dans la lignée *GAL2805*, le fonds génétique de ces deux lignées a été homogénéisé à celui de Cs et leur capacité de mémoire testée.

Les lignées homozygotes *NP2310* et *E02338* présentent toutes deux un défaut de MRA à 24 heures après un conditionnement massé (**Fig. 27**). Cependant, un défaut similaire est observé à 24 heures après un protocole long (**Fig. 27**). En guise de contrôle positif, le mutant *teq^P* qui affecte la MLT et pas la MRA, a été testé en parallèle. Il présente également un défaut après conditionnement long, confirmant que de la MLT pouvait effectivement être formée lors de cette expérience.

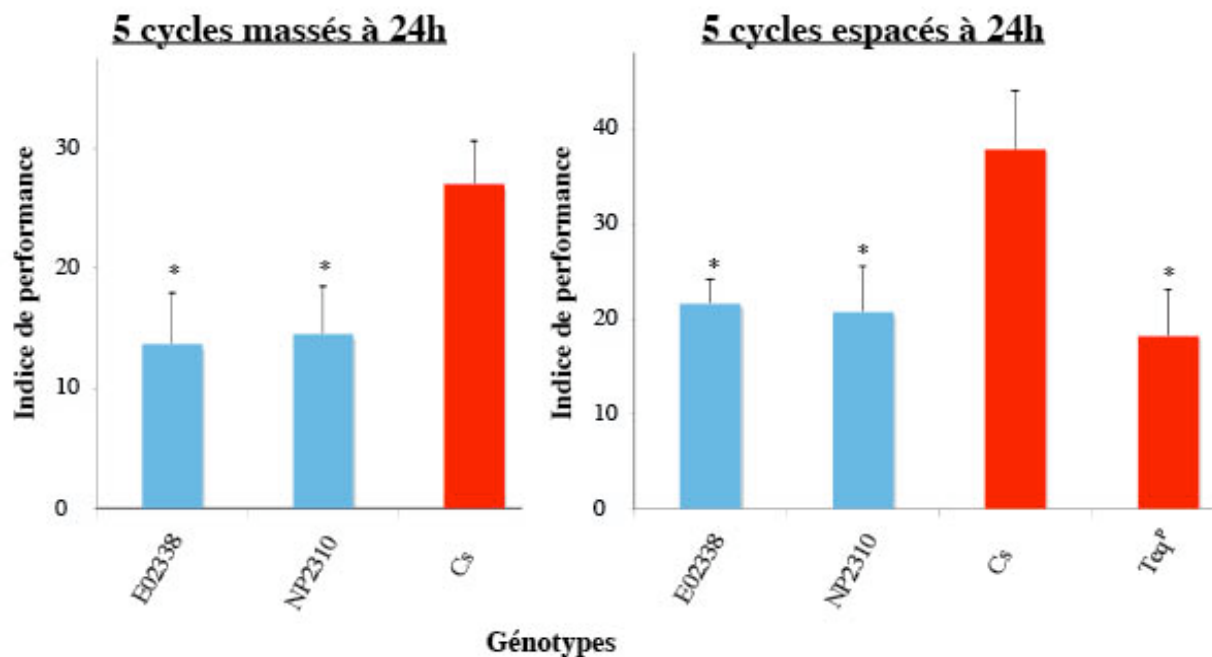


Figure 27 : Les lignées homozygotes NP2310 et E02338 présentent des défauts de MRA et de MLT à 24 heures.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé (partie gauche du graphique) ou long (partie droite). Après un conditionnement massé, les mouches Cs diffèrent significativement de E02338 ($P < 0.05$) et de NP2310 ($P < 0.05$). Après un conditionnement long, les mouches Cs diffèrent significativement de E02338 ($P < 0.05$), de NP2310 ($P < 0.05$) et de *Teq^P* ($P < 0.05$). $n \geq 12$ pour tous les génotypes.

Nous avons donc cherché si le défaut non-spécifique de mémoire observé dans les lignées *NP2310* et *E02338* pouvait être corrélé à un défaut de développement. Une analyse morphologique des CPs par immunohistochimie sur coupes paraffines a donc été réalisée sur la lignée *NP2310* avec l'anticorps anti-DCO qui marque l'ensemble des CPs (corps cellulaires, calices, pédoncule et tous les lobes). Les lobes médians γ apparaissent normaux dans la lignée *NP2310* comparés à Cs (Figure X A et B). Néanmoins, sur un grand nombre de cerveaux de la lignée *NP2310*, les lobes verticaux α' apparaissent plus fins que dans la lignée contrôle, ou s'enroulant mal autour des lobes α , voire sont inexistantes (ou non détectables par l'anticorps) (Fig. 28). Ainsi, dans la lignée *NP2310*, le défaut phénotypique plus fort obtenu dans les expériences comportementales s'accompagne d'une malformation des lobes α' des CPs.

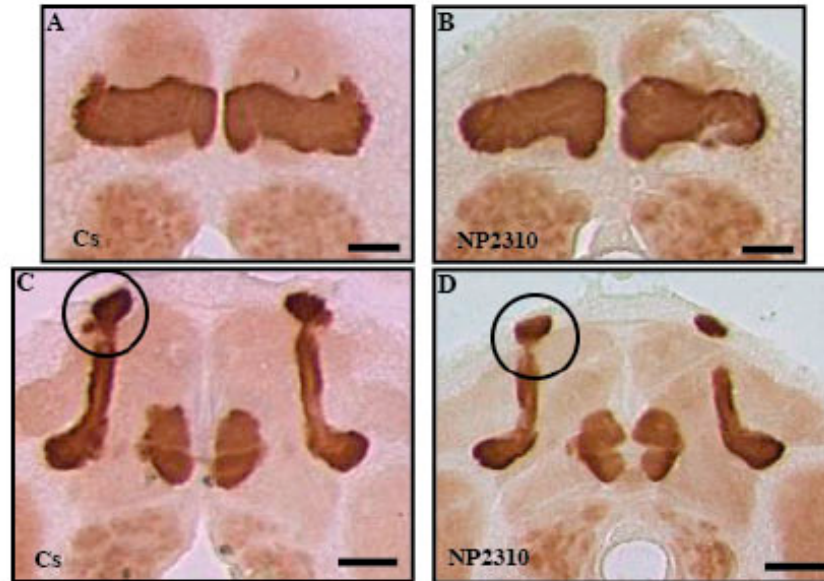


Figure 28 : La lignée homozygote *NP2310* présente une malformation des lobes α' des CPs.

Les CPs sont détectés à l'aide d'un anticorps anti-DCO. L'échelle représente 40 μm . A-B Coupe frontale de cerveaux Cs et *NP2310* au niveau des lobes γ des CPs. C-D Coupe frontale de cerveaux Cs et *NP2310* au niveau des lobes verticaux α/α' et médians β/β' des CPs. La zone entourée indique la présence des lobes α' dans les mouches Cs (C) et leur absence dans *NP2310* (D). Les lobes α' ne sont pas détectés sur un autre plan de coupe.

Etant donné le défaut de mémoire non-spécifique observé dans les lignées *NP2310* et *E02338* et le défaut anatomique présent dans les mutants *NP2310*, l'étude de ces deux allèles mutants du gène *megad* a été arrêtée. Il faudrait néanmoins par ailleurs vérifier que le défaut de MLT obtenu dans la lignée *E02338* est effectivement dû à une malformation des lobes α' par une étude anatomique.

1.3.2 L'inhibition constitutive de *megad* par ARNi affecte la MRA et la MLT

Afin de cibler plus spécifiquement le rôle du gène *megad* dans la formation de la MRA, deux lignées *UAS-RNAi* ont été commandées au National Institute of Genetics (Kyoto, Japon, <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly>): *RNAi megad 1* (8034-R1) et *RNAi megad 6* (8034-R6). Ces deux lignées ARN interférents ciblent la même séquence d'ARNm. Les mouches exprimant les deux ARNi selon le pilote d'expression de *GAL2805* (dans les CPs) ont été conditionnées avec le protocole massé et leur performance mnésique calculée à 24 heures. Les mouches *GAL2805/+ ; RNAi megad 1/+* présentent un défaut de MRA par rapport aux lignées contrôles *RNAi megad 1/+ ; GAL2805/+* et Cs. Une légère chute est observée dans les mouches *GAL2805/+ ; RNAi megad 6/+*

mais celle-ci est non-significative par rapport aux contrôles (**Fig. 29**). Cependant, les expériences réalisées au laboratoire sur un grand nombre de lignées ont révélé qu'il était fréquent qu'une même séquence ARNi puisse avoir des effets différents en fonction de son point d'insertion.

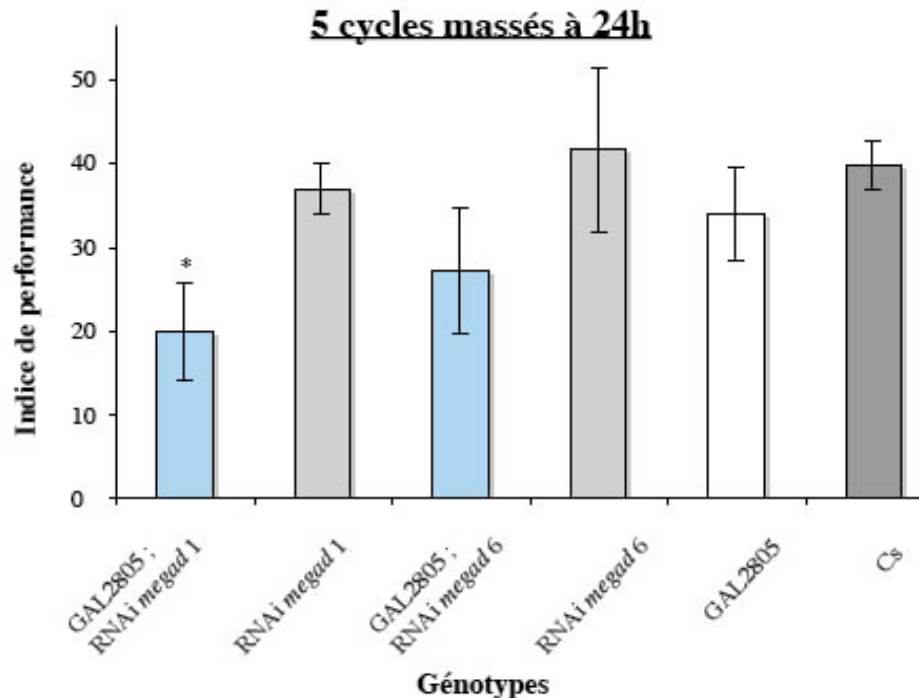


Figure 29 : La MRA est affectée par l'expression du RNAi *megad 1* selon le pilote d'expression de *GAL2805*.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé. Les mouches *GAL2805;RNAi megad 1* diffèrent significativement des mouches *RNAi megad 1* ($P= 0.026$), *GAL2805* ($P= 0.047$) et *Cs* ($P= 0.011$) avec un test de Student. Aucune différence significative n'est détectée entre *GAL2805 ; RNAi megad 6* et *RNAi megad 6* ($P= 0.385$), *GAL2805* ($P= 0.554$) et *Cs* ($P= 0.262$). $n=10$ pour tous les génotypes sauf *GAL2805 ; RNAi megad 6* ($n=6$) et *RNAi megad 6* ($n=6$).

Nous avons ensuite voulu savoir si la MLT est également affectée lorsque l'on pilote l'expression de l'ARNi *megad* avec *GAL2805*. Après un conditionnement long, la MLT est significativement plus basse à 24 heures dans les mouches *GAL2805/+ ; RNAi megad 1/+* par rapport aux contrôles hétérozyotes et *Cs* (**Fig. 30**).

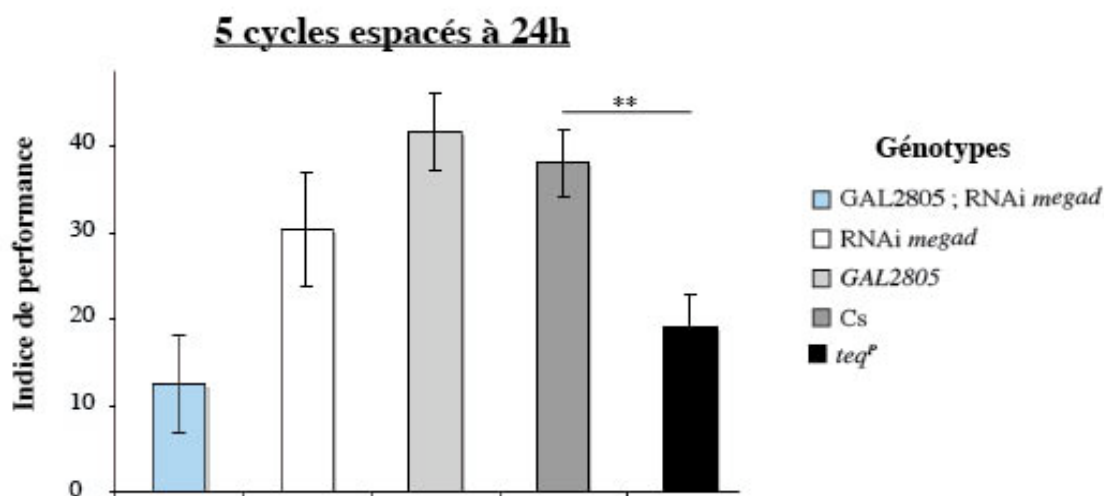


Figure 30 : La MLT est affectée par l'expression de l'ARNi *megad 1* selon le pilote d'expression de *GAL2805*.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les mouches GAL2805 ;RNAi *megad 1* diffèrent significativement des mouches RNAi *megad 1* ($P= 0.049$), GAL2805 ($P= 0.016$) et Cs ($P= 0.007$) avec un test de Student. Les mouches *teq^P* diffèrent significativement des mouches Cs ($P= 0.003$). $n=10$ pour tous les génotypes.

Les défauts observés lorsque l'ARNi est exprimé dans les CPs sont similaires à ceux observés dans les mutants *NP2310* et *E02338* (**Fig. 27**). Ainsi, il est fort probable que le défaut de MLT soit également dû à une malformation des lobes α' consécutive à l'expression de l'ARNi dans les CPs tout au long du développement. Il faudrait néanmoins confirmer cette hypothèse par une étude anatomique.

1.3.3 L'inhibition conditionnelle de *megad* au stade adulte dans tous les neurones affecte spécifiquement la MRA

Afin de s'affranchir d'éventuels défauts anatomiques dus à l'expression de l'ARNi tout au long du développement, nous avons décidé d'utiliser le système conditionnel Switch (cf. introduction, 2.1.7). Le pilote d'expression *elav-Switch* permet d'exprimer l'ARNi dans tous les neurones uniquement au stade adulte.

Après un conditionnement massé, la mémoire à 24 heures des mouches *elav-Sw/+ ; RNAi megad 1/+* est significativement différente de celle des contrôles (**Fig. 31**). De plus, après un protocole

long, la MLT à 24 heures n'est pas significativement différente de celle des contrôles (**Fig. 31**). Ainsi, le gène *megad* joue un rôle physiologique dans la formation de la MRA mais pas de la MLT. Ce résultat a été confirmé par des résultats similaires obtenus avec le pilote d'expression conditionnel *MB-Switch*, spécifique des CPs (cf. article, 1.2)

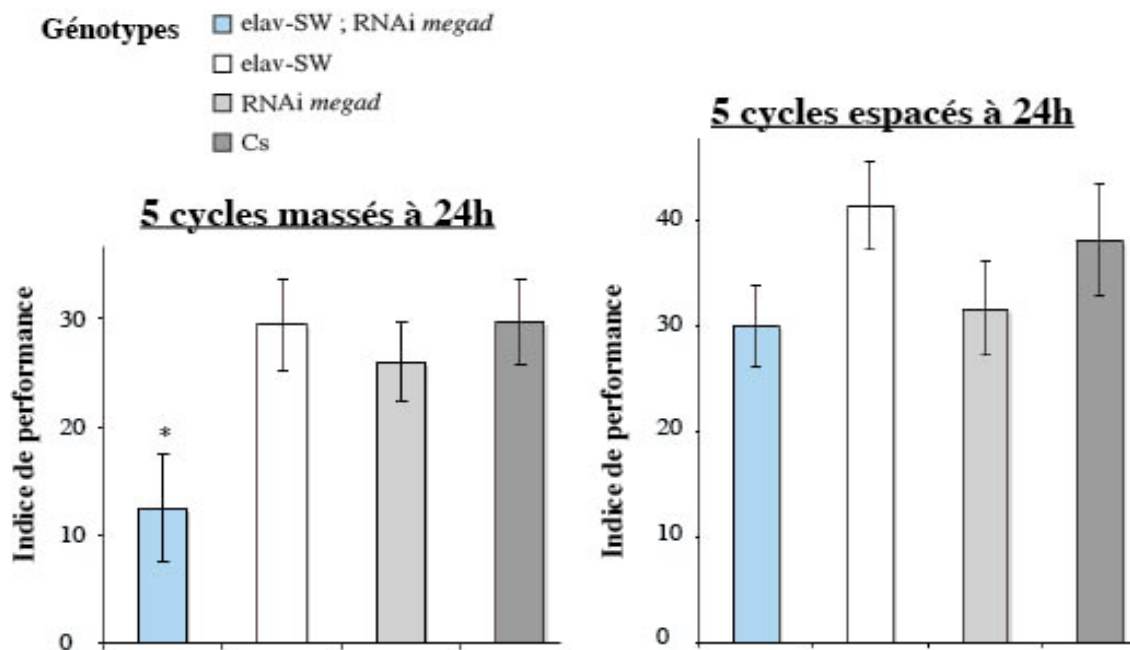


Figure 31 : Le gène *megad* joue un rôle physiologique dans la formation de la MRA.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé (partie gauche du graphique) ou long (partie droite). Après un conditionnement massé, les mouches *elav-Switch ; RNAi megad 1* diffèrent significativement des mouches *elav-Switch* ($P= 0.041$), *RNAi megad 1* ($P= 0.017$) et Cs ($P= 0.013$) avec un test de Student. Après un conditionnement espacé, aucune différence significative n'est détectée entre *elav-Switch ; RNAi megad 1* et *elav-Switch* ($P= 0.054$), *RNAi megad 1* ($P= 0.781$) et Cs ($P= 0.212$). $n \geq 13$ pour tous les génotypes.

1.3.4 La sur-expression de *megad* n'affecte pas la MRA

Dans le but d'étudier l'effet d'une sur-expression de *megad*, deux lignées P-EP ont été sélectionnées : $P\{EP\}CG8034^{EP1550}$ et $P\{EP\}CG8034^{EP991}$. Dans ces deux souches, l'élément-P contenant de nombreuses séquences UAS est inséré dans les séquences régulatrices en amont du gène. Ainsi, en croisant ces lignées avec le pilote d'expression *MB-Switch*, il est possible d'étudier l'effet d'une surexpression du gène *megad* chez l'adulte.

Après un conditionnement massé, la mémoire des mouches *megad*^{EP991/+}; MB-Switch/+ et *megad*^{EP1550/+}; MB-Switch/+ à 24 heures ne diffère pas significativement de celle des mouches contrôles hétérozygotes et de Cs (**Fig. 32**). Ainsi, la sur-expression du gène *megad* dans les CPs de mouches adultes ne semble pas avoir d'effet sur la formation de la MRA. Il faudrait néanmoins vérifier qu'il y a bien une sur-expression du gène par l'analyse quantitative du transcrit (PCR en temps réel) ou de la protéine (Western-Blot).

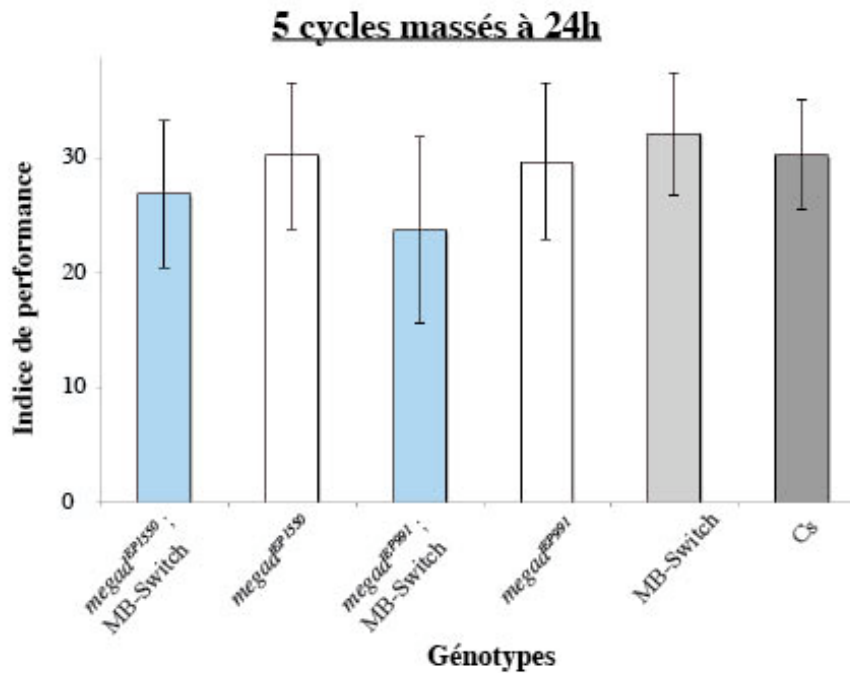


Figure 32 : La surexpression du gène *megad* dans les CPs de mouches adultes n'a pas d'effet sur la MRA.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé uniquement avec les femelles. Les mouches *megad*^{EP1550/+}; MB-Switch/+ ne diffèrent pas significativement des mouches *megad*^{EP1550/+} (P= 0.713), MB-Switch (P= 0.523) et Cs (P= 0.671) avec un test de Student. Les mouches *megad*^{EP991/+}; MB-Switch/+ ne diffèrent pas significativement des mouches *megad*^{EP991/+} (P= 0.814), MB-Switch (P= 0.779) et Cs (P= 0.991) avec un test de Student. n≥10 pour tous les génotypes.

2 Identification de neurones extrinsèques aux corps pédonculés impliqués dans la mémoire olfactive aversive

2.1 Crible de neurones extrinsèques aux corps pédonculés

2.1.1 Crible originel

47 lignées *GAL4* ont été criblées en collaboration avec le groupe de Kei Ito (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo, Japon) afin d'identifier des neurones de sortie de la mémoire aversive et notamment de la mémoire à long terme. Les lignées ont été sélectionnées pour marquer des neurones extrinsèques aux CPs, soit sur la base de résultats publiés (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008) soit sur la base de marquages disponibles en accès libre sur internet.

Ces différentes lignées *GAL4* ont été croisées à la souche *UAS-shi^{ts}* et comparées au contrôle *UAS-shi^{ts}/+* afin de vérifier que l'éventuel défaut de mémoire obtenu n'est pas lié à une fuite de *shi^{ts}*. L'absence de contrôle hétérozygote *GAL4/+* pourrait induire des résultats « faux positifs » puisque l'effet de l'insertion du *GAL4* n'est pas contrôlé. Cependant, vu le grand nombre de lignées testées, il était plus aisé dans un premier temps de comparer les scores des mouches *GAL4 ; UAS-shi^{ts}* avec le seul contrôle *UAS-shi^{ts}/+*.

Les mouches ont été conditionnées avec le protocole long à température permissive (20°C). Elles ont ensuite été stockées à température permissive puis testées 24 heures plus tard à température restrictive (> 30°C).

L'expression du transgène *UAS-shi^{ts}* à température restrictive donne un défaut de mémoire avec 9 pilotes d'expression, sur les 47 d'origine : *MZ0604*, *NP225*, *NP2492*, *NP2583*, *NP3253*, *NP6369*, *NP677*, *NP689*, *NP7318* (**Table 1**).

Les lignées *NP3253* et *NP225* expriment *GAL4* dans les neurones de projection. Ainsi, il est fort probable que le défaut de mémoire observé soit lié à un problème d'olfaction dû au blocage de la neurotransmission de neurones olfactifs. Ces lignées ont été sélectionnées dans une liste de neurones extrinsèques aux CPs sans avoir vérifié les neurones marqués au préalable. Ainsi, le crible ayant été réalisé en aveugle, ces résultats confirment la validité de l'approche utilisée.

Le crible entrepris avait pour but premier l'identification de neurones extrinsèques aux CPs impliqués dans le rappel de la MLT. Ainsi, le fait que la plupart des génotypes *GAL4/shi^{ts}* ne présente pas de défaut, lors du rappel de la MLT ne signifie pas pour autant que les autres neurones

extrinsèques criblés ne sont pas requis dans d'autres conditions pour la mémoire olfactive aversive. Il serait ainsi intéressant d'étudier le rôle des neurones marqués dans ces lignées en les bloquant pendant l'apprentissage et/ou la consolidation ; ou en testant d'autres types de mémoire, comme la MRA, la MCT ou la MMT.

Table 1 : Résultats du crible de neurone extrinsèques aux CPs. (pages suivantes)

La colonne « type » indique le nom des neurones déjà caractérisés (Tanaka et al., 2008). Les scores indiqués dans les colonnes GAL4/Shi et GAL4/+ présentent des valeurs moyennes suivies de l'écart-type de la moyenne. La valeur de P indiquée est celle obtenue par comparaison des scores des groupes GAL4/Shi et GAL4/+ avec un test de Student. Le nombre de groupes de mouches testées pour chaque lignée GAL4 est indiqué dans la colonne « n ». Les lignées surlignées en rouge sont celles présentant un défaut de mémoire significatif lors du crible.

La deuxième partie de la table indique le profil d'expression de la lignée quand il est connu avec dans l'ordre : le nom de la lignée GAL4, la localisation des corps cellulaires des neurones extrinsèques aux CPs, leur zone de projection sur les lobes des CPs, leur zone de projection sur d'autres régions des CPs et enfin la zone de projection dans d'autres régions du cerveau.

aimpr : protocerebrum antérieur inféro-médial

asmpr : protocerebrum antérieur supéro-médial

iACT : tractus antenno-glomérulaire intérieur

LA : lobes antennaires

milpr : protocerebrum médian inféro-latéral

mslpr : protocerebrum médian supéro-latéral

mmspr : protocerebrum médian supéro-médial

oACT : tractus antenno-glomérulaire extérieur

pilpr : protocerebrum postérieur inféro-latéral

pimpr : protocerebrum postérieur inféro-médial

plpr : protocerebrum postérieur latéral

pslpr : protocerebrum postérieur supéro-latéral

psmpr : protocerebrum postérieur supéro-médial

vmpr : protocerebrum ventro-médial

SOG : ganglion sous-oesophagien

Type	Lignée <i>Gal4</i>	MLT à 24 heures			
		Shi/ <i>Gal4</i>	Shi/+	p	n
	<i>C232</i>	18,7 +/- 4,4	23,8 +/- 3,2	0,3751	5
	<i>C584</i>	8,5 +/- 4,9	21,6 +/- 9	0,2019	6
	<i>MZ0019</i>	18,6 +/- 7,5	25,9 +/- 6,8	0,489	6
	<i>MZ0512-2</i>	23,4 +/- 7,2	19 +/- 5,3	0,6134	6
	<i>MZ0520-1</i>	11,9 +/- 3,9	11,45 +/- 4,7	0,9455	8
MB-MV1	<i>MZ0604</i>	3,95 +/- 6,5	19,3 +/- 5,5	0,0925	6
	<i>MZ0655YU</i>	21,6 +/- 7,9	25,4 +/- 4,2	0,6925	4
MB-V1	<i>MZ0840</i>	9,4 +/- 20	22,3 +/- 3,3	0,57	5
	<i>NP0002</i>	20,9 +/- 6,8	20,2 +/- 6	0,9365	8
	<i>NP0063</i>	13,7 +/- 5,3	16,2 +/- 2,3	0,6765	6
	<i>NP0086</i>	13,75 +/- 4,6	22,3 +/- 3,3	0,12	8
oACT	<i>NP1017</i>	30,1 +/- 8,6	22,3 +/- 3,3	0,43	7
iACT	<i>NP225</i>	-12,5 +/- 10,2	30,3 +/- 5,4	0,0509	4
MB-M1/M7 et CP1	<i>NP2297</i>	13,4 +/- 1,8	19 +/- 4,2	0,2496	8
MB-C1	<i>NP2331</i>	19,2 +/- 12,2	17 +/- 5,2	0,7177	4-6
MB-V2	<i>NP2492</i>	3,8 +/- 4,1	22,3 +/- 3,3	0,00265	8
MB-MVP1	<i>NP2583</i>	10,8 +/- 5,9	27,3 +/- 5,1	0,0473	12
MB-MP1	<i>NP2758</i>	12,8 +/- 4,8	21,2 +/- 5,4	0,2633	7
	<i>NP3019</i>	16,8 +/- 4,2	19,3 +/- 3,6	0,6504	6
	<i>NP3090</i>	15,6 +/- 8,3	25,6 +/- 6	0,356	6
	<i>NP3128</i>	33 +/- 3,9	30,2 +/- 6,4	0,7266	4
	<i>NP3137</i>	25,7 +/- 4,2	30,6 +/- 7,4	0,5785	8
	<i>NP3250</i>	21,6 +/- 7,5	28,9 +/- 5,7	0,4668	5
imACT	<i>NP3253</i>	3.5 +/- 4,3	23,2 +/- 4,8	0	6
	<i>NP3265</i>	22,8 +/- 6,2	19 +/- 4,2	0,6183	8
	<i>NP3515</i>	26,3 +/- 6,2	22,3 +/- 3,3	0,59	7
MB-M4	<i>NP393</i>	15,6 +/- 1,3	17,4 +/- 5,1	0,7352	8
MB-MVP1	<i>NP5034</i>	16,2 +/- 7,5	22,3 +/- 3,3	0,45	8
oACT	<i>NP5103</i>	15,05 +/- 8,9	21,2 +/- 5,4	0,6765	6
	<i>NP5104</i>	17,9 +/- 7,3	19,3 +/- 5,5	0,8793	6
	<i>NP5130</i>	20,2 +/- 4,4	34,1 +/- 9,3	0,2829	4
MB-M2	<i>NP5270</i>	24,8 +/- 4,9	26,1 +/- 3,2	0,83	5
MB-MV2	<i>NP5330</i>	9,4 +/- 3,1	19 +/- 6,1	0,1913	7
MB-M1/VP1	<i>NP6014</i>	10,3 +/- 7,1	19,4 +/- 3,2	0,1312	8
	<i>NP6028</i>	11,2 +/- 6,6	17,4 +/- 5,3	0,4681	8
	<i>NP6259</i>	11,1 +/- 5,8	25,9 +/- 6,8	0,1298	6
	<i>NP6369</i>	8,5 +/- 4,9	21,6 +/- 3,5	0,0832	6
MB-MVP1	<i>NP6510</i>	22,6 +/- 10,5	25,2 +/- 5,7	0,8235	4
	<i>NP6557</i>	23,9 +/- 4,6	30 +/- 4,7	0,3717	7
MB-DPM	<i>NP677</i>	13 +/- 5,2	22,3 +/- 3,3	0,265	8
MB-V3	<i>NP689</i>	13,6 +/- 3,8	30,6 +/- 7,4	0,0666	8
	<i>NP7078</i>	19,4 +/- 8,7	26,8 +/- 4,3	0,4787	5
	<i>NP7197</i>	12,1 +/- 4,3	19,3 +/- 5,5	0,3281	6
	<i>NP7254</i>	21,95 +/- 4,3	26,9 +/- 4	0,4325	4
	<i>NP7318</i>	6,8 +/- 3	23,2 +/- 4,8	0,0238	5
MB-M2	<i>NP7323</i>	14,8 +/- 6,4	24 +/- 2,8	0,8529	6
	<i>NP7452</i>	25,7 +/- 6	25,45 +/- 8,8	0,9848	6

Lignée Gal4	Corps cellulaire	Lobes	Autre zone	Zone de connection
			des CPs	
C232	-	-	-	corps en ellipse
C584	-	-	-	corps en éventail
MZ0019	?	γ	-	-
MZ0512-2	?	tous	-	corps en ellipse
MZ0520-1	-	-	-	-
MZ0604	ventrolatéral aux calices	γ, α'	-	aimpr, vmpr
MZ0655YU	-	-	-	corps en ellipse
MZ0840	latéral aux calices	verticaux	-	msmpr
NP0002	?	verticaux	-	-
NP0063	ventrolatéral aux lobes médians	médians	-	corps en ellipse
NP0086	ventrolatéral aux lobes médians	médians	-	corps en ellipse
NP1017	latéraux aux calices	-	calices	LA, corne latérale
NP225	dorsaux et latéraux aux calices	-	calices	LA, corne latérale, plpr
NP2297(M1/7)	antérieur aux lobes médians et	médians	-	aimpr, asmpr, msmpr
NP2297(CP1)	ventrolatéraux aux calices	-	calices, pédoncule	aimpr
NP2331	plpr	-	calices	corne latérale
NP2492	latéraux aux calices	verticaux	-	corne latérale, msmpr
NP2583	antérieurs aux lobes verticaux	α, β	pédoncule	asmpr, msmpr, psmpr, psldr, mslpr
NP2758	latéral aux calices	γ	pédoncule	aimpr, mimpr, asmpr, msmpr
NP3019	?	médians	-	corps en éventail
NP3090	-	-	-	-
NP3128	-	-	-	-
NP3137	-	-	-	-
NP3250	-	-	-	-
NP3253	latéraux aux calices	-	calices, pédoncule	LA, corne latérale, SOG
NP3265	?	tous	-	Corps en ellipse
NP3515	-	-	-	-
NP393	antérieur à la pars	β'	-	aimpr
NP5034	antérieurs aux lobes verticaux	α, β	pédoncule	asmpr, msmpr, psmpr, psldr, mslpr
NP5103	latéraux aux calices	-	calices	LA, corne latérale
NP5104	?	verticaux	-	corps en éventail
NP5130	-	-	-	-
NP5270	antérieur aux lobes médians	γ	-	aimpr
NP5330	vmpr	β, α'	-	asmpr, msmpr
NP6014(M1)	antérieur aux lobes médians	médians	-	aimpr, asmpr, msmpr
NP6014(VP1)	antérieurs aux lobes verticaux	α	pédoncule	msldr, psldr, psmpr
NP6028	-	-	-	-
NP6259	-	-	-	-
NP6369	-	-	-	-
NP6510	antérieurs aux lobes verticaux	α, β	pédoncule	asmpr, msmpr, psmpr, psldr, mslpr
NP6557	-	-	-	-
NP677	ventral aux calices	tous	pédoncule	-
NP689	SOG	α	-	asmpr, psmpr, msmpr
NP7078	?	verticaux	-	complexe central
NP7197	-	-	-	-
NP7254	-	-	-	-
NP7318	-	médians	-	corps en éventail

NP7323	antérieur aux lobes médians	γ	-	aimpr
NP7452	-	-	-	-

2.1.2 Etude de la MLT dans les lignées identifiées

Le fonds génétique des sept lignées identifiées lors du crible a été homogénéisé et celles-ci ont ensuite été re-testées dans les mêmes conditions avec les contrôles appropriés.

Le blocage de la neurotransmission des neurones marqués dans les lignées *NP2492*, *NP677*, *MZ0604*, *NP689* et *NP677* induit un défaut de MLT (**Fig. 33**), confirmant les résultats obtenus lors du crible. Aucune différence significative n'est détectée avec un test de Student entre les mouches *NP6369/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et les différents contrôles, suggérant que le défaut de MLT initialement observé dans la lignée *NP6369* était lié au fonds génétique. Pour la lignée *NP7318*, une différence significative est observée entre les groupes comprenant l'élément P et celles ne l'ayant pas, suggérant que la chute initialement observée est liée à l'insertion du *GAL4*.

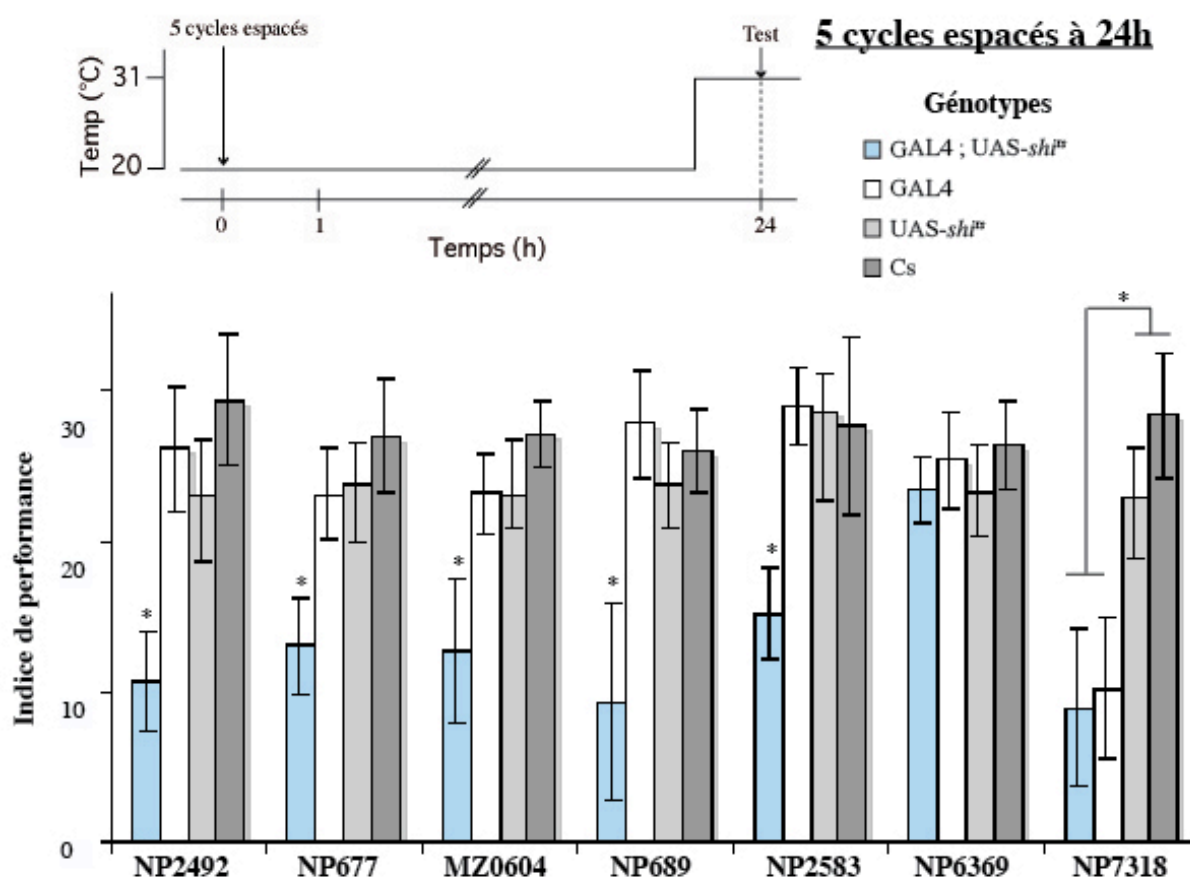


Figure 33 : Résultats du crible après homogénéisation du fonds génétique.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Les astérisques indiquent une différence significative ($P < 0.05$) entre le génotype *GAL4 ; UAS-shi^{ts}* et les trois contrôles : *GAL4*, *Cs* et *UAS-shi^{ts}*. Pour la lignée *NP7318*, une différence significative est détectée entre d'une part *NP7318/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) et *Cs* ($P < 0.05$) ; et *NP7318/+ et +/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) et *Cs* ($P < 0.05$) d'autre part. $n \geq 10$ pour tous les génotypes.

2.1.3 Contrôles olfactifs

Afin de vérifier que les sens requis pour la formation d'une mémoire olfactive aversive sont normaux, des contrôles d'olfaction ont été réalisés. A température restrictive, les mouches sont soumises simultanément à des chocs électriques et à l'odeur O. Leur évitement à l'odeur aversive M par rapport à l'air est ensuite mesuré quelques minutes plus tard (Preat, 1998). Aucune lignée *GAL4 ; UAS-shi^{ts}* ne présente de différences significatives avec tous les contrôles, ni pour l'octanol, ni pour le méthylcyclohexanol (**Fig. 34**). Ainsi le défaut observé lors du crible est bien un défaut de mémoire puisque leur olfaction est normale.

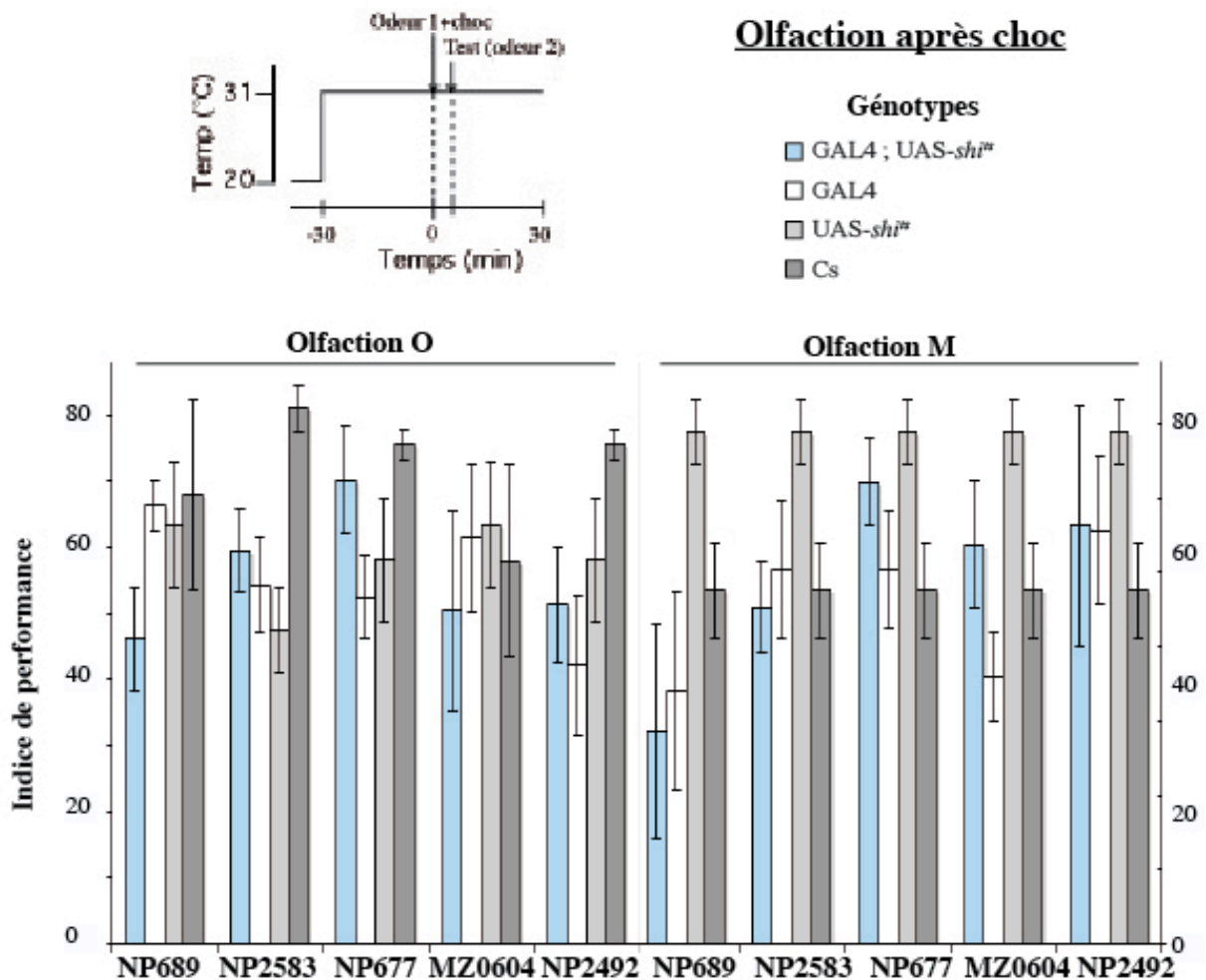


Figure 34 : Contrôles olfactifs.

Les mouches sont soumises à l'odeur 1 et à des chocs électriques simultanément, leur évitement à l'odeur aversive 2 est mesurée quelques minutes plus tard. Toute l'expérience a lieu à température restrictive. Aucune différence significative n'est détectée avec un test de Student. n=8 pour tous les génotypes.

Afin de vérifier les profils d'expression des différentes lignées, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés *in toto*. Les neurones MB-MVP1 sont bien marqués dans la lignée *NP2583* ; cependant, le co-marquage avec un anticorps anti-Fas II a révélé que le cœur des CPs est également marqué dans cette lignée (**Fig. 35**). La neurotransmission des lobes α/β étant requise pour le rappel de la MLT (Isabel et al., 2004), nous ne pouvons pas déterminer si le défaut de mémoire observé lors du crible est dû au blocage des neurones MB-MVP1 ou bien au blocage des lobes des CPs. L'étude de cette lignée a donc été arrêtée ; néanmoins, il serait possible d'étudier le rôle de ces neurones MB-MVP1 en co-exprimant MB-GAL80 afin d'inhiber l'expression du transgène *UAS-shi⁴⁵* dans les cellules de Kenyon, permettant de s'affranchir du blocage de la neurotransmission des lobes α/β .

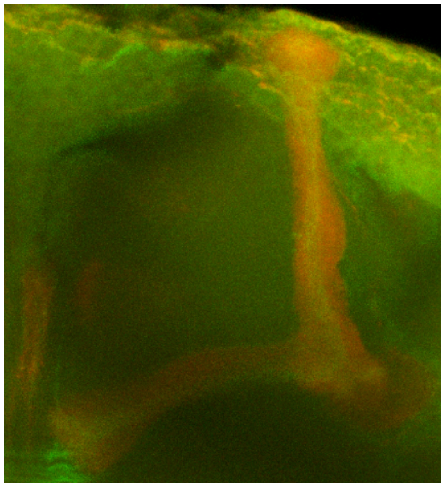


Figure 35 : Profil d'expression de la lignée NP2583.

Les cerveaux de mouches *NP2582/UAS-CD8 ::GFP* sont analysés par microscopie confocale à l'aide d'un anticorps anti-GFP (en vert). Les corps pédonculés sont marqués par un anticorps anti-Fas II (en rouge). Le cœur des CPs apparaît en jaune car il est reconnu par les deux anticorps

Les profils d'expression des quatre autres lignées *GAL4* sont détaillés dans les parties correspondantes.

2.2 Article II : Mushroom Body Efferent MB-V2 Neurons Are Required For Aversive Olfactory Memory Retrieval In *Drosophila*

Cet article en cours de soumission correspond à une partie de mon travail de thèse réalisé en collaboration avec K. Ito (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Tokyo, Japon ; contribution : banque de données sur les lignées extrinsèques aux CPs), Yoshinori Aso et Hiromu Tanimoto (Max Planck Institut für Neurobiologie, Martinsried, Allemagne ; contribution : anatomie).

Résumé : Nous avons montré que les neurones MB-V2 sont les neurones de sortie des CPs pour la mémoire olfactive aversive. La neurotransmission de ces neurones est requise aussi bien pour le rappel des mémoires précoces que des mémoires tardives mais pas pendant l'apprentissage ni la consolidation. Les neurones MB-V2 sont efférents aux CPs et projettent sur le protocérébrum moyen supéro-latéral et la corne latérale, impliquée dans la réponse aux odeurs aversives. Les neurones MB-V2 pourraient ainsi augmenter l'évitement à l'odeur associée au choc électrique via un renforcement de la voie naturelle d'échappement à l'odeur au niveau de la corne latérale.

**Mushroom Body Efferent MB-V2 Neurons Are Required For Aversive Olfactory Memory
Retrieval In *Drosophila***

**Julien Séjourné¹, Yoshi Aso², Rio Tedjakumala², Guillaume Isabel¹, Kei Ito³, Hiromu
Tanimoto^{2,4} and Thomas Preat^{1,4}**

¹ *Genes and Dynamics of Memory Systems, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI, Paris, France.*

² *Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, Germany.*

³ *Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo
113-0032, Japan.*

⁴ *These authors contributed equally to this work.*

Mushroom bodies (MB) and several afferent neurons play a key role in *Drosophila* olfactory memory¹⁻⁵. However, if important molecular and cellular mechanisms involved in learning and memory consolidation have been identified, we do not know how olfactory memory is retrieved from the MB. Thus, MB signalling is required both for short-lasting and long-lasting memory retrieval⁶⁻⁸, but output MB neurons that convey olfactory memory information have not yet been described. Using the Gal4/ Shire^{ts} system that allows a transient blockade of neurotransmission in a determined set of neurons^{9,10}, we screened MB extrinsic neurons for their role in olfactory memory retrieval. We show that MB-V2¹¹ are MB output neurons that convey aversive olfactory memory. Neurotransmission from MB-V2 was required for both early and long-lasting memory retrieval. In contrast MB-V2 neurotransmission was not required during acquisition and consolidation. We show that there are about 75 MB-V2 neurons, all efferent to either α or α' MB vertical lobes. MB-V2 neurons project to the lateral horn (LH), a brain region involved in the avoidance of aversive odors¹², and to the middle superiormedial protocerebrum (msmpr). These results add a stone to our understanding of the organization of brain networks involved in olfactory memory, and they suggest that during aversive memory, retrieval reactivation of the memory trace in the MB activates the MB-V2/LH pathway. The preferential avoidance of the conditioned odour during memory retrieval would thus be linked to the activation of the pathway involved in repulsive odour avoidance in naïve flies¹².

Memory processing involves three temporally distinct steps: learning, memory consolidation and memory retrieval. In *Drosophila melanogaster*, associative learning occurs for example when flies are exposed simultaneously to an electric shock (unconditioned stimulus) and an odorant³ (conditioned stimulus). A single-associative learning trial induces formation of short-term and middle-term memories, two forms of labile memory, and anaesthesia-resistant memory (ARM), a consolidated memory. Multiple training sessions give rise to two types of memories; ARM is formed after massed conditioning (without rest intervals between conditioning cycles) while long-term memory (LTM), a consolidated memory that depends on *de novo* protein synthesis, forms after spaced conditioning¹³.

The mushroom bodies (MB), a bilateral structure in the central brain, are composed of about 5000 intrinsic neurons, named the Kenyon cells¹⁴. There are three main classes of Kenyon cells, γ neurons that send medial axonal projections, α/β neurons that branch to form α vertical lobes and β medial lobes, and α'/β' neurons that branch to form α' vertical lobes and β' medial lobes.

Anatomical disruption of the MB revealed that this structure is the centre of olfactory memory^{1,2}, and that vertical lobes in particular are necessary for LTM formation¹⁵. Moreover recent imaging studies revealed that a short-term memory trace forms in α'/β' neurons¹⁶, and a LTM trace in the α lobes¹⁷. MB receive olfactory inputs from the antennal lobes through projection neurons (PNs). PN axons are branched and project on the calyx, the dendritic terminals of the MB, and on the lateral horn (LH). PN terminals are stereotyped at the level of both MB¹⁸ and LH^{19,20}. To explore the role of MB neurons in memory processing, several studies have used the Gal4/UAS-Shibire thermosensitive (Shi^{ts}) system that allows to transiently inactivate synaptic transmission in a subset of specific neurons^{9,10}. It was shown that neurotransmission from α'/β' neurons is required for 3-hour memory formation and consolidation, but not during memory retrieval²¹. On the contrary, neurotransmission from α/β neurons is required to retrieve all phases of aversive olfactory memory but neither for 30-min^{6,22}, 2-hour⁸ and 3-hour^{7,22} memory formation nor for consolidation (the Gal4/UAS- shi^{ts} tool did not allow to discriminate the respective role of α and β lobes in memory retrieval because the Shi^{ts} toxin can be addressed only to all synapses of α/β neurons). If MB signalling is crucial for memory retrieval, the networks that convey olfactory information from the MB remain unknown, and we do not know how the memory trace is translated into a behavioural response. In this study, we used the Gal4/UAS- shi^{ts} tool to screen for MB extrinsic neurons^{11,23} that could be involved in olfactory memory processing, and in particular in aversive memory retrieval.

A particular set of MB extrinsic neurons, MB-V2, are labelled in the Gal4 driver lines *NP2492*¹¹ and *MZI60*^{11,23} (Fig.1a, b). MB-V2 neurons cell bodies locate in the area posterior to the LH (Fig.1). From there, they project to the vertical lobes of the MB, the LH and the middle superiomedial protocerebrum (msmpr; an area just posterior to the tip of the α and α' lobes) (Fig.1). Although additional brain structures were labelled in these Gal4 lines, such as the fan-shaped body in *NP2492* and the optic lobes in *MZI60*, the expression in MB-V2 neurons was the only one noticeably shared in these two lines (Supplementary Movies 1 and 2). Our cell body count identified about 75 MB-V2 neurons, a higher number than previously reported¹¹. To determine the fine morphology of individual MB-V2 neurons we used the Flp-out technique²⁰ with *NP2492/UAS-CD8::GFP* flies (see Methods). Out of 247 specimens examined, we obtained 29 single cell clones of MB-V2 neurons. Based on their projection pattern, we identified two subtypes, MB-V2 α neurons that innervate the MB α lobes and terminate in the dorsal LH (Fig.1c), and MB-V2 α' neurons that innervate MB α' lobes and terminate in the ventral LH (Fig.1d). MB-V2 α are more abundant than MB-V2 α' . Both of them have terminals in the msmpr in ipsi- and contra-lateral hemispheres.

Before addressing the role of MB-V2 neurons in memory retrieval, we first checked that olfactory acuity was normal in *NP2492/UAS- shi^{ts}* and *MZI60/UAS- shi^{ts}* flies (Table 1,

Supplementary Information). We then assessed whether MB-V2 signalling was required during 2-hour memory retrieval, by blocking these neurons transmission during the test after a single conditioning. A strong memory decrease was observed in *NP2492/UAS-shi^{ts}* flies compared to the control groups (Fig. 2a₁). A similar decrease was observed in *MZI60/UAS-shi^{ts}* flies (Fig. 2a₂), showing that MB-V2 neurons are required for 2-hour memory retrieval. We then examined whether the acquisition and consolidation of olfactory memory shared a similar requirement for MB-V2 transmission. When MB-V2 output was blocked during training and consolidation but not during retrieval in *NP2492/UAS-shi^{ts}* (Fig. 2b₁) and *MZI60/UAS-shi^{ts}* (Fig. 2b₂) flies, memory performances were indistinguishable from those of control flies. Thus MB-V2 neurons were specifically required for 2-hour memory retrieval. We next measured 3-min memory performance when the output of these neurons was blocked during training and test. In these conditions, both *NP2492/UAS-shi^{ts}* (Fig. 2c₁) and *MZI60/UAS-shi^{ts}* flies (Fig. 2c₂) showed a reduced short-term memory performance. Since MB-V2 output was not required during training (Fig. 2b), these results show that MB-V2 transmission was required for early-memory retrieval.

This first set of results establish that MB-V2 neurons that project to MB vertical lobes play a major role in early memory retrieval. However this observation contradicts a previous report in which we showed that *alpha-lobes-absent (ala)* flies without vertical lobes do not form LTM but have a normal 3 hour memory after a single conditioning¹⁵. If output from MB-V2 neurons is essential for memory retrieval, how do *ala* mutants without vertical lobes retrieve short-term memory? To address this question, we examined the morphology of MB-V2 neurons in *ala* mutant flies. Interestingly, in *ala* mutants without vertical lobes MB-V2 neurons projected to MB medial lobes (Fig.2d,e). This new connectivity of MB-V2 neurons onto the medial lobes was consistent (n=11), though the position and density of the terminals varied among the samples (compare left and right hemispheres in Fig.2d,e). MB-V2 terminals in the msmpr and LH were normally present in *ala* flies without vertical lobes (see Supplementary Movie 3). This result suggests that in *ala* flies lacking MB vertical lobes, MB-V2 connection to the medial lobes allows to retrieve 3-hour memory. We initially suggested that the normal 3-hour memory displayed by *ala* flies without vertical lobes might be due to the fact that in wild-type flies short-term memory could be formed and retrieved from either the α or the b lobes¹⁵. However, by analyzing single *ala* neurons, we later showed that some neurons without vertical projection still bifurcate with both branches following a medial track²⁴. Thus in *ala* mutants without vertical lobes it is possible that the MB-V2 neurons now connect to the "collapse" a branch that runs medially. Altogether these results suggest that in wild-type flies aversive 3-hour memory is retrieved through MB vertical lobes and the MB-V2 pathway.

To assess whether MB-V2 output required for LTM retrieval, we blocked these neurons during the test 24 hours after 5 cycles of spaced conditioning. A strong decrease of performance was observed in *NP2492/UAS-shi^{ts}* (Fig. 3a). Similarly, ARM retrieval was impaired in *NP2492/UAS-shi^{ts}* flies when MB-V2 neurons were blocked during the test 24 hours after massed conditioning (Fig. 3b), but not when flies were kept at permissive temperature during training and test (Fig. S1, Supplementary Informations). These results show that MB-V2 neurotransmission is also required for long-lasting memory retrieval.

To further understand how the neuronal circuit of the MB and MB-V2 neurons function during memory retrieval, it was essential to acquire information on MB-V2 polarity. Ito et al. (1998) expressed in *MZI60* neurons a presynaptic marker, neuronal-synaptobrevin-GFP S65T fusion (n-Syb::GFP) and observed staining in the vertical lobes and msmpr terminals of MB-V2 neurons (terminals in the LH could not be characterized because another track, the iACT, is labelled in *MZI60*). We re-examined the neuronal polarity of MB-V2 neurons by expressing a more specific marker of presynaptic terminals, synaptotagmin-eGFP fusion protein (syt::eGFP)²⁵, with *NP2492* and *MZI60* drivers. With syt::eGFP, the GFP signal was highly enriched in the msmpr (Fig. 4e and k) and the LH (Fig. 4f), and absent from MB vertical lobes (Fig. 4d and j). Similar results were obtained with Syt::HA²⁶ (data not shown). These results strongly suggest that MB-V2 neurons receive inputs from the vertical lobes of the MB, and are presynaptic to msmpr and LH neurons.

By transiently blocking synaptic transmission from extrinsic neurons during memory formation, we found that MB-V2 transmission is required to retrieve olfactory aversive memory. Although the molecular pathways underlying short-term memory, ARM and LTM differ^{8,27}, a common neuronal network is used to retrieve these memories. MB-V2 neurons were found to be post-synaptic to MB α and α' lobes, and to project to the msmpr and the LH. Thus, two olfactory pathways converge towards the LH area. One that transmits odour information directly from the antennal lobes via the projection neurons, and one that integrates additional information through the MB. During learning, the association between odour and electric shock leads to the formation of memory traces in the MB, in α'/β' lobes a few minutes after a single training¹⁶, and in the α lobes a few hours after spaced conditioning^{15,17}. For memory retrieval, activation of Kenyon cells by projection neurons during presentation of the trained odour re-activates the MB memory trace, which should in turn stimulate MB-V2 α and MB-V2 α' neurons. Interestingly, in naïve flies, the LH processes the response to repellent odorants¹². Thus, we hypothesize that avoidance of the trained odour during memory retrieval occurs after MB-V2 transmission on the LH that would overactivate the pathway normally used for odour avoidance.

Methods

Stocks and olfactory conditioning

Drosophila melanogaster wild-type strain Canton-Special (Canton-S) and mutant flies were raised at 18°C, 60% humidity in a 12:12 h light:dark cycle. All strains used for memory experiments were outcrossed to flies with a Canton-S background. Enhancer trap line *NP2492* [X] and *MZI60* [III] were identified through a large-scale database screening for mushroom body extrinsic neurons^{11,23}.

Flies were conditioned by exposure to an odour paired with electric shocks and subsequent exposure to a second odour in the absence of shock, as previously described¹⁵. Conditioning was performed on samples of 30-40 flies aged between 2 and 3 days. Because *NP2492* P-element insertion is on the X chromosome, only *NP2492/+;UAS-shi^{ts}/+* females were taken into account (referred to as *NP2492/UAS-shi^{ts}* in the paper) as well as for the respective genotypic controls. *Shibire^{ts}* permissive and restrictive experiments were performed at 20°C and at 33°C respectively. Tubes and bottles were prewarmed at the appropriate temperature before flies transfer.

Statistical analysis

Each graph displays mean values +/- SEM. A one-way ANOVA was performed on each set of data followed by pairwise planned comparisons between relevant groups with a Student-Newman-Keuls test.

Immunohistochemical analysis

Crosses

We examined at least three female F1 progenies (5-10 days after eclosion at 25°C) between males of corresponding Gal4 lines and females carrying single copy of *UAS-mCD8::GFP* [II]²⁸, three copies of *UAS-mCD8::GFP* [I, II and III], or *UAS-syt::eGFP* [II]. For counting cell bodies of MB-V2 neurons, *NP2492; UAS-mCD8::GFP* were crossed with *MZI60*.

To examine projection pattern of MB-V2 neurons in the *ala* mutant background, we first recombined *NP2492* with *ala^{E13}* mutation¹⁵. *NP2492,ala^{E13}* females were crossed to *UAS-mCD8::GFP* [I, II and III] males.

For single-cell clonal analyses, *y w hsp70-flp; UAS>CD2 y >mCD8::GFP/CyO; TM2/TM6b²⁰* females were crossed to *NP2492* males. To remove the Flp out cassette (*CD2 y*), one day post-

eclosion adult animals received a heat shock at 37°C for 30–45 minutes. Five to seven days after heat shock, Non *Cy* female progeny from this cross were selected for the single-cell analysis.

Immunohistochemistry

Brains were dissected in Ringer's solution, fixed in phosphate-buffered saline containing 2% formaldehyde and 0.1% Triton X-100 (PBT; Sigma, St. Louis, MO) for 45 min at room temperature, and subsequently rinsed with PBT three times (2x 10min). After blocking with PBT containing 3% normal goat serum (Sigma) for 30 min at room temperature, brains were incubated with the primary antibodies in PBT at 4°C overnight. Gal4 expressing cells and overall neuropils were stained with a rabbit polyclonal antibody against GFP (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR) and a mouse monoclonal antibody against Synapsin, a presynaptic protein (3C11; 1:250)²⁹, respectively. Brains were washed with PBT three times for 20 min and incubated with secondary antibodies in the blocking solution at 4°C overnight. We used as secondary antibodies Alexa Fluor488-conjugated goat anti-rabbit (1:1000; Molecular Probes) and Cy3-conjugated (1:250) goat anti-mouse IgG. Finally, brains were rinsed with PBT (3x 20 min + 1x 1h) and mounted in Vectashield (Vector, Burlingame, CA). Frontal optical sections of whole-mount brains were taken using confocal microscopy (Olympus FV1000) and analyzed with Images of Image-J (NIH).

To better visualize faint processes of the labelled neurons, stained fibres and counterstaining in most figures were presented in white (RGB ratio; 255:255:255) and orange (255:85:0), respectively. Nomenclature of brain regions followed Otsuna and Ito (2006). In this report we use the term “brain” collectively for the supra and suboesophageal ganglia.

References

- ¹ Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D., *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* **2** (1), 1 (1985).
- ² de Belle, J. S. and Heisenberg, M., Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263** (5147), 692 (1994).
- ³ DeZazzo, J. and Tully, T., Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci* **18** (5), 212 (1995).

- 4 Schwaerzel, M. et al., Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* **23** (33), 10495 (2003).
- 5 Waddell, S. et al., The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* **103** (5), 805 (2000).
- 6 Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T., Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* **411** (6836), 476 (2001).
- 7 McGuire, S. E., Le, P. T., and Davis, R. L., The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* **293** (5533), 1330 (2001).
- 8 Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T., Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* **304** (5673), 1024 (2004).
- 9 Brand, A. H. and Perrimon, N., Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118** (2), 401 (1993).
- 10 Kitamoto, T., Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J Neurobiol* **47** (2), 81 (2001).
- 11 Tanaka, N. K., Tanimoto, H., and Ito, K., Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* **508** (5), 711 (2008).
- 12 Wang, Y. et al., Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Curr Biol* **13** (21), 1900 (2003).
- 13 Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., and Del Vecchio, M., Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79** (1), 35 (1994).
- 14 Ito, K. et al., The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124** (4), 761 (1997).
- 15 Pascual, A. and Preat, T., Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* **294** (5544), 1115 (2001).
- 16 Wang, Y., Mamiya, A., Chiang, A. S., and Zhong, Y., Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci* **28** (17), 4368 (2008).
- 17 Yu, D., Akalal, D. B., and Davis, R. L., *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* **52** (5), 845 (2006).
- 18 Jefferis, G. S. et al., Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* **128** (6), 1187 (2007).

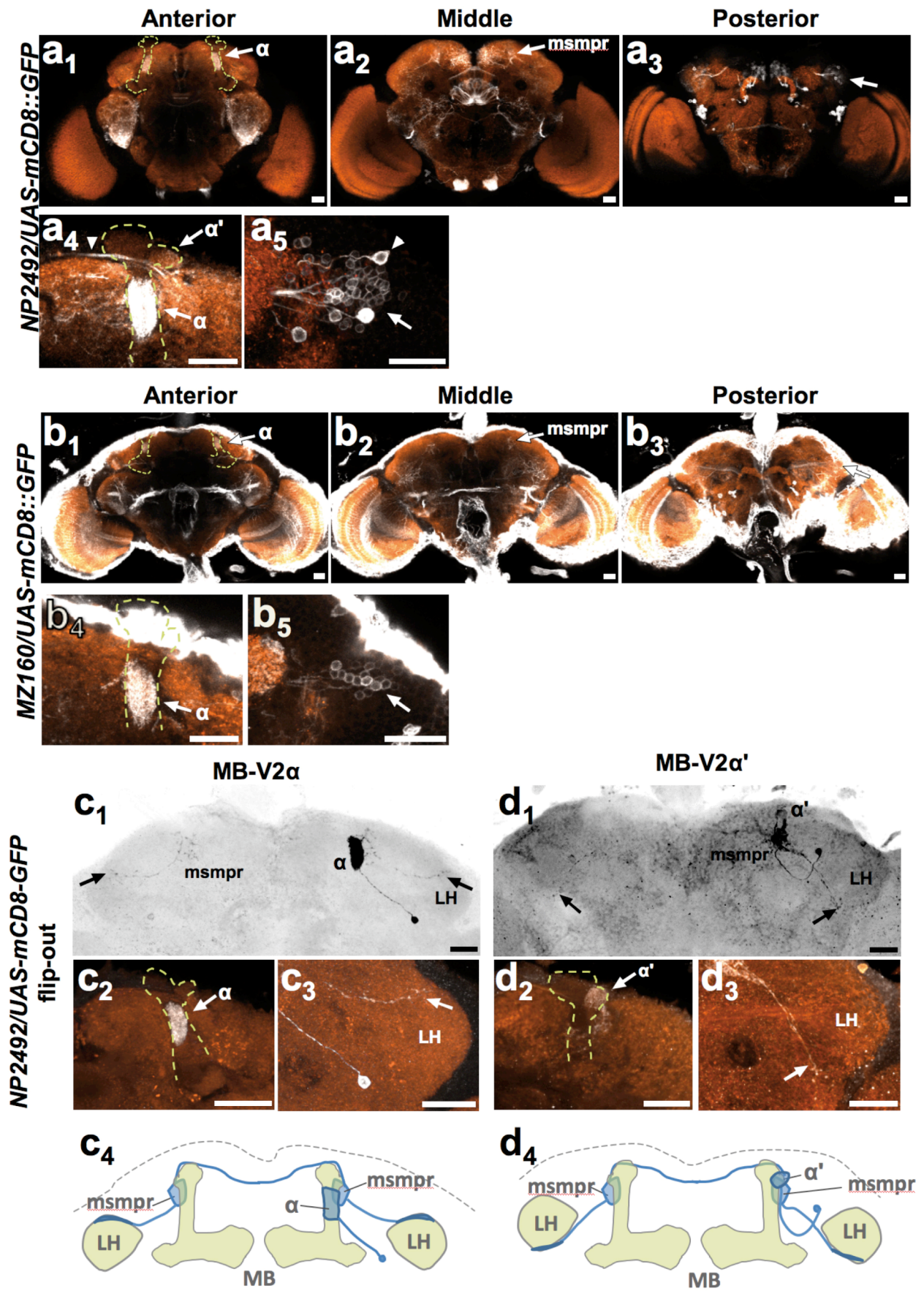
- 19 Marin, E. C. et al., Representation of the glomerular olfactory map in the Drosophila brain. *Cell* **109** (2), 243 (2002).
- 20 Wong, A. M., Wang, J. W., and Axel, R., Spatial representation of the glomerular map in the Drosophila protocerebrum. *Cell* **109** (2), 229 (2002).
- 21 Krashes, M. J. et al., Sequential use of mushroom body neuron subsets during drosophila odor memory processing. *Neuron* **53** (1), 103 (2007).
- 22 Schwaerzel, M., Heisenberg, M., and Zars, T., Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* **35** (5), 951 (2002).
- 23 Ito, K. et al., The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in Drosophila melanogaster Meigen. *Learn Mem* **5** (1-2), 52 (1998).
- 24 Pascual, A., Chaminade, M., and Preat, T., Ethanolamine kinase controls neuroblast divisions in Drosophila mushroom bodies. *Dev Biol* **280** (1), 177 (2005).
- 25 Zhang, Y. Q., Rodesch, C. K., and Broadie, K., Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. *Genesis* **34** (1-2), 142 (2002).
- 26 Robinson, I. M., Ranjan, R., and Schwarz, T. L., Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca(2+) binding in the C(2)A domain. *Nature* **418** (6895), 336 (2002).
- 27 McGuire, S. E., Deshazer, M., and Davis, R. L., Thirty years of olfactory learning and memory research in Drosophila melanogaster. *Prog Neurobiol* **76** (5), 328 (2005); Keene, A. C. and Waddell, S., Drosophila olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* **8** (5), 341 (2007).
- 28 Lee, T. and Luo, L., Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22** (3), 451 (1999).
- 29 Klagges, B. R. et al., Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in Drosophila. *J Neurosci* **16** (10), 3154 (1996).
- 30 Menzel, R. and Muller, U., Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* **19**, 379 (1996).
- 31 Mauelshagen, J., Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* **69** (2), 609 (1993).
- 32 Okada, R., Rybak, J., Manz, G., and Menzel, R., Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *J Neurosci* **27** (43), 11736 (2007).

³³ Grunewald, B., Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* **404** (1), 114 (1999).

Supplementary Information accompanies the paper on...

Acknowledgments We thank Joachim Urban and Gehrard M. Technau for *MZI60* line. We thank Vincent Hakim and members of our laboratories for helpful discussions and I. Siwanowicz for technical assistance. This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche, the Fondation Bettencourt-Schueler, the Fondation pour la Recherche Médicale (to T.P.), and from the Emmy-Noether Program from Deutsche Forschungsgemeinschaft, Max-Planck-Gesellschaft (to H.T.). J.S. and G.I. were supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, Y.A. was supported by Deutscher Akademischer Austausch Dienst.

Author Information The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.P. (thomas.preat@espci.fr).



Séjourné et al., Figure 1

Fig. 1. MB-V2 MB extrinsic neurons constitute the only network labelled in both *NP2492* and *MZI60* Gal4 lines. Projection of the confocal stacks showing expression pattern of the Gal4 drivers, *NP2492* (**a**) and *MZI60* (**b**), visualized with mCD8::GFP. Throughout the figures, whole mount brains are shown in frontal view and dorsal is up. Neuropils were counterstained with anti-synapsin antibody (orange). In each panel, arrows indicate the cell bodies and terminals of MB-V2 neurons, and MB lobes are outlined with dashed lines.

a, Gal4 expression pattern of *NP2492*. Projection of anterior (**a₁**), middle (**a₂**), and posterior (**a₃**) part of the brain. MB-V2 neurons innervate MB vertical lobes (**a₁** and **a₄**), the middle superiomedial protocerebrum (msmpr) (**a₂**) and the lateral horn (LH) (**a₃**). Arrowhead in **a₄** indicates the commissural tract of MB-V2 neurons. There are a few non-MB-V2 cells that project to the anterior ventral part of the LH (arrowhead in **a₅**). See also supplemental movies for the raw confocal stacks and brain staining interpretation.

b, Gal4 expression pattern of *MZI60*. Confocal projection magnifying the lobes of the MB (**b₄**) or cell bodies of MB-V2 (**b₅**).

c, d, Clonal analyses identified two types of MB-V2 neurons. Single cell flip-out clone of MB-V2 α (**c**) and MB-V2 α' (**d**) neurons visualized with mCD8::GFP (black in **c₁** and **d₁**; white in **c₂₋₃** and **d₂₋₃**). MB-V2 α neurons arbour MB α lobes (**c₁**) and project to the msmp and the dorsal part of the LH (**b₂₋₃**; n=23). MB-V2 α' neurons that arbour the α' lobes (**c₁**) project to the msmp, and the ventral part of the LH (**b₂₋₃**; n=6). Collateral of MB-V2 α' neurons further extend to the area medial and ventral to the LH. **c₄**, **d₄** Schematic diagrams of the two distinct types of MB-V2 neurons (blue) relative to the MB and LH (light green). Dashed lines outline the brain surface. Scale bars: 20 μ m.

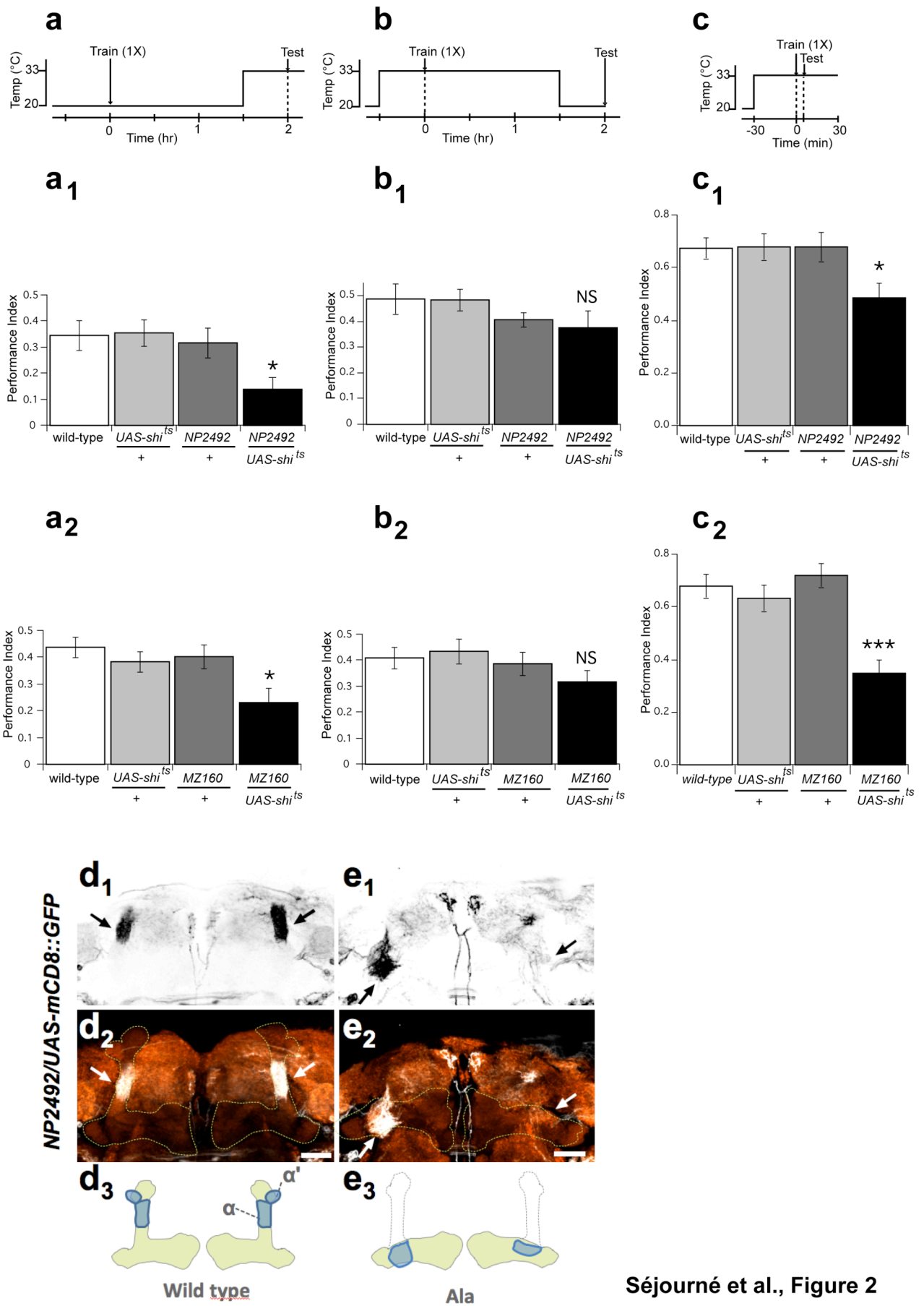


Fig. 2. Neurotransmission from MB-V2 neurons is required during retrieval of 2-hour memory but during neither learning nor consolidation. The temperature shift protocols are shown above each graph. Asterisks denote significant differences with ANOVA (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). NS: non-significant ANOVA.

a, Blocking MB-V2 neurons output during retrieval impairs 2-hour memory. (a₁) ANOVA revealed a significant difference ($F(3,50) = 3.577$, $P < 0.05$). Planned pair-wise comparisons revealed that *NP2492/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *NP2492* ($P < 0.05$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) and wild-type ($P < 0.05$). $n \geq 12$ groups. (a₂) ANOVA revealed a significant difference ($F(3,48) = 4.002$, $P < 0.05$). Planned pair-wise comparisons revealed that *MZI60/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *MZI60* ($P < 0.05$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) and wild-type ($P < 0.05$). $n \geq 13$ groups.

b, Blocking MB-V2 neurons output during training and consolidation does not affect 2-hour memory. (b₁) ANOVA revealed no significant difference between any of the groups ($F(3,41) = 0.547$, $P = 0.6532$). $n \geq 10$ groups. (b₂) ANOVA revealed no significant difference between any of the groups ($F(3,44) = 1.179$, $P = 0.33$). $n \geq 12$ groups.

c, Blocking MB-V2 neurons output during learning impairs 3-minute memory.

(c₁) ANOVA revealed a significant difference ($F(3,40) = 4.054$, $P = 0.0132$). Planned pair-wise comparisons revealed that *NP2492/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *NP2492* ($P < 0.05$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) and wild-type ($P < 0.05$). $n \geq 11$ groups. (c₂) ANOVA revealed a significant difference ($F(3,28) = 11.512$, $P < 0.0001$). Planned pair-wise comparisons revealed that *MZI60/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *MZI60* ($P < 0.001$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.001$) and wild-type ($P < 0.001$). $n \geq 8$ groups.

d, e, In *ala* flies without vertical lobes, MB-V2 neurons innervate the MB medial lobes.

Terminals of MB-V2 neurons in the MB visualized with mCD8::GFP in the wild type (d) or *ala* mutant background (e). mCD8::GFP (black in d₁ and e₁; white in d₂ and e₂). Anti-synapsin (orange). Arrows indicate terminal of MB-V2 neurons. In all examined brain samples without vertical lobes, MB-V2 neurons innervated medial lobes but with a variable terminals density (left and right hemispheres in e). Terminals in the msmpr and the LH were preserved, although some additional terminals were found in the medial protocerebrum (data not shown). Schematic diagrams of the MB-V2 neurons terminals (blue) in wild type (d₃) and *ala* (e₃). The MB are shown in light green. Scale bars: 20 μm .

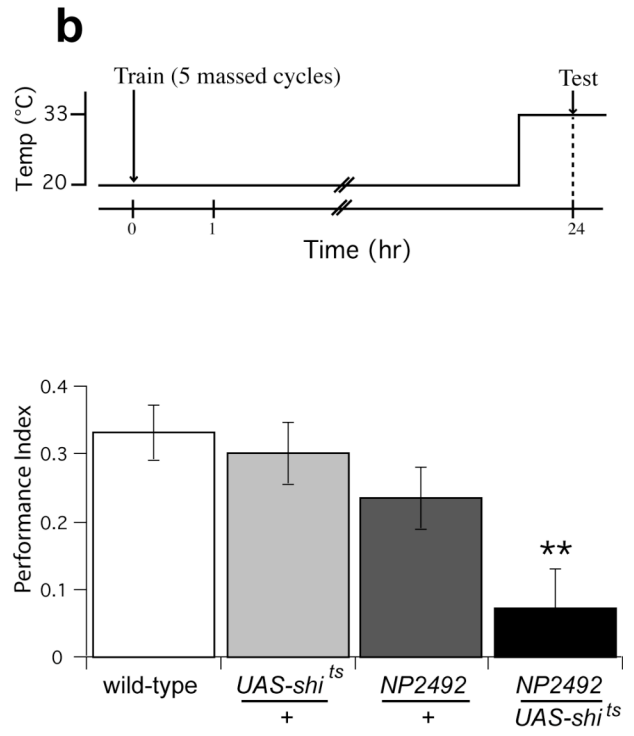
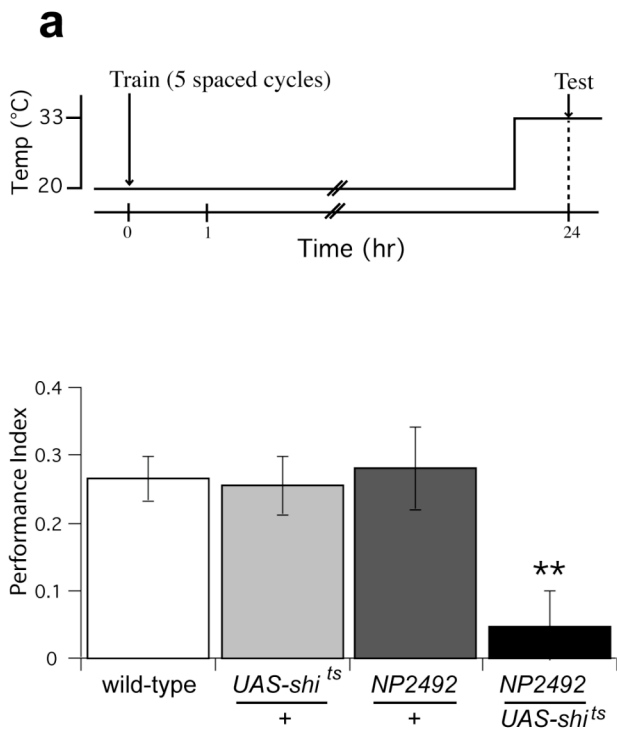
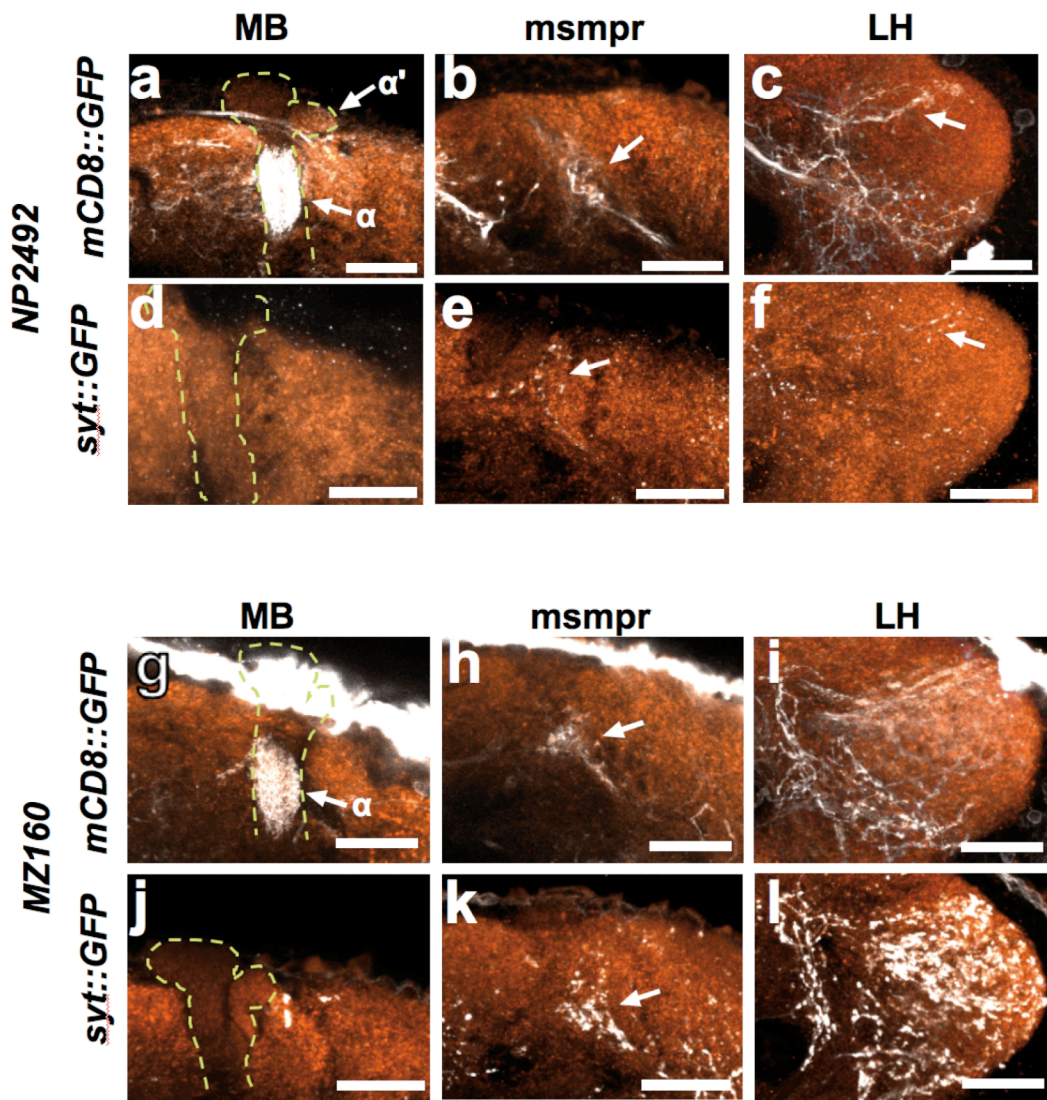


Fig. 3. Neurotransmission from MB-V2 neurons is required during retrieval of long-lasting memory. The temperature shift protocols are shown above each graph. Asterisks denote significant differences with ANOVA (** $P < 0.01$).

a, Blocking MB-V2 neurons output during retrieval impairs LTM. ANOVA revealed a significant difference ($F(3,36) = 5.938$, $P = 0.0021$). Planned pair-wise comparisons revealed that *NP2492/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *NP2492* ($P < 0.05$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.01$) and wild-type ($P < 0.01$). $n \geq 10$ groups.

b, Blocking MB-V2 neurons output during retrieval impairs ARM. ANOVA revealed a significant difference ($F(3,52) = 4.245$, $P = 0.0093$). Planned pair-wise comparisons revealed that *NP2492/UAS-shi^{ts}* is significantly different from *NP2492* ($P < 0.05$), *UAS-shi^{ts}* ($P < 0.01$) and wild-type ($P < 0.05$). $n \geq 14$ groups.



Séjourné et al., Figure 4

Fig. 4. MB-V2 neurons are efferent to the MB. Distribution of mCD8::GFP (**a-c** and **g-i**) and syt::eGFP (**d-f** and **j-l**) of the MB-V2 neurons in *NP2492* (**a-f**) and *MZI60* (**g-l**) in the vertical lobes of the MB (**a, d, g,** and **j**), the msmpr (**b, e, h,** and **k**) and the LH (**c, f, i,** and **j**) counterlabelled with a neuropile marker synapsin (orange). *NP2492* and *MZI60* Gal4 were used in (**a**) and (**b**), respectively. Terminals in the msmpr and the LH horn were labelled with syt::eGFP (**e, f, k**), whereas terminals in the α and α' lobes were not labelled (**d** and **j**). In *MZI60*, labelling of the iACT terminals prevented to examine the presynaptic terminals of MB-V2 neurons in the LH (**l**).

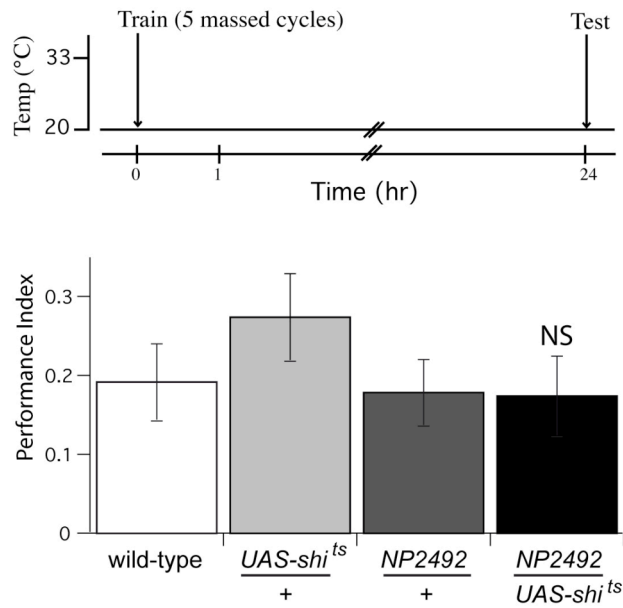


Table 1

Genotype	Odor Avoidance	
	Octanol	Methylcyclohexanol
wild-type	0.50 ± 0.11	0.56 ± 0.10
<i>UAS-shi^{ts}</i>	0.49 ± 0.08	0.70 ± 0.08
<i>MZ160</i>	0.59 ± 0.09	0.59 ± 0.08
<i>MZ160/UAS-shi^{ts}</i>	0.59 ± 0.06	0.59 ± 0.06
wild-type	0.54 ± 0.12	0.53 ± 0.11
<i>UAS-shi^{ts}</i>	0.51 ± 0.08	0.70 ± 0.06
<i>NP2492</i>	0.45 ± 0.10	0.80 ± 0.04
<i>NP2492/UAS-shi^{ts}</i>	0.49 ± 0.10	0.78 ± 0.07

Figure S1. Training and testing under permissive conditions does not induce a memory defect in *NP2492/UAS-shi^{ts}* flies. Flies were trained with 5 massed cycles and maintained under permissive conditions until tested at 24 hour. ANOVA revealed no significant difference between any of the groups ($F(3,30) = 0.8980$, $P = 0.4536$). $n \geq 8$ groups.

Table 1. Sensory acuity controls. Odour avoidance was assayed by measuring the choice of naïve flies between odour and air bubbled through mineral oil. Flies were shifted at restrictive temperature 30 min before test. One-way ANOVA revealed no significant differences in the first four genotypes (wild-type, *UAS-shi^{ts}*, *MZ160* and *UAS-shi^{ts}/MZ160*) either with Octanol ($F(3,28) = 0.1939$, $P = 0.8996$) or Methylcyclohexanol ($F(3,28) = 0.7933$, $P = 0.5079$). One-way ANOVA revealed no significant differences in the last four genotypes (wild-type, *UAS-shi^{ts}*, *NP2492* and *NP2492/UAS-shi^{ts}*) either with Octanol ($F(3,28) = 0.01528$, $P = 0.9974$) or Methylcyclohexanol ($F(3,28) = 1.331$, $P = 0.2841$). $n \geq 8$ groups.

Movies

NP2492. Besides expression in the MB-V2 neurons, we observed labelling of two glomeruli in the antennal lobes innervated by olfactory sensory neurons, optic tubercle, ventral lateral protocerebrum (anterior), superior and inferior medial protocerebrum, subesophageal ganglion and fan shaped body (middle), posterior lateral protocerebrum, LH and cells on the posterior cortex (posterior).

MZ160. Besides expression in the MB-V2 neurons, we observed strong expression in the optic lobes and surface glia, projection neurons of the antennal lobes (iACT and mACT; <20), antennal mechanosensory and motor center, and ventral lateral protocerebrum (anterior), great commissure, lateral triangle of the central complex, protocerebrum surrounding the peduncle (middle), axon bundle and terminals of projection neurons from the antennal lobes and cells on the posterior cortex (posterior).

2.3 Les neurones DPM sont impliqués dans le rappel de la mémoire à long terme

2.3.1 Profil d'expression de la lignée NP677

Dans la lignée *NP677* identifiée lors du crible, le Gal4 est exprimé dans les neurones DPM (dorsal pair medians), précédemment caractérisés comme jouant un rôle pendant la consolidation (cf. introduction, 2.4.2.1 (Waddell et al., 2000)). En collaboration avec Yoshinori Aso et Hiromu Tanimoto (Max Planck Institut für Neurobiologie, Martinsried, Allemagne), nous avons vérifié le profil d'expression de cette lignée (**Fig. 36**). Comme il a été décrit précédemment (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008), les corps cellulaires de la paire de neurones DPM (une cellule dans chaque hémisphère) sont situés dans la zone postérieure dorsale du cerveau, dans le protocerebrum postérieur inféro-médian, ventralement par rapport aux calices des CPs (**Fig. 36-B et C**). La projection du corps cellulaire part antéro-dorsalement et bifurque en deux branches au niveau du *msmpr*. La branche médiale entre dans les lobes médians par la pointe. La branche verticale bifurque une seconde fois avant d'entrer dans les lobes verticaux ; une branche entre par la face postérieure, l'autre branche passe ventralement par rapport aux lobes médians et rentre dans les CPs au niveau de la zone latérale du lobe γ . Les projections innervent assez largement les lobes des CPs et également la partie la plus antérieure du pédoncule. D'autres neurones sont marqués dans la lignée *NP677*, notamment le tractus mécano-sensoriel, situé latéralement aux lobes antennaires, et le corps en éventail.

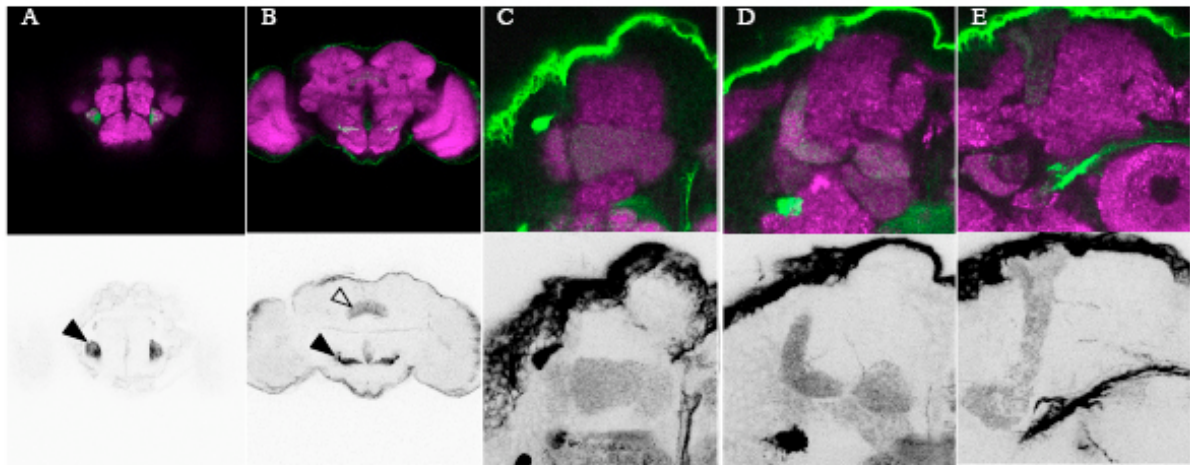


Figure 36 : Profil d'expression de la lignée NP677.

Les cerveaux de mouches *NP677/UAS-CD8 ::GFP* sont analysés par microscopie confocale à l'aide d'un anticorps anti-GFP (en vert sur les images du haut, en gris sur celles du bas). Le neuropile est marqué par un anticorps anti-synapsine (violet en haut). A-B : le tractus mécano-sensoriel (point de flèche pleine) et le corps en éventail (point de flèche creuse) sont marqués dans la lignée *NP677*. C-D-E : Les neurones DPM innervent assez largement les CPs, au niveau des lobes γ (C), des lobes médians β/β' (D) et des lobes verticaux α/α' (E).

Nous avons voulu vérifier que les neurones marqués dans la lignée *NP677* sont bien les neurones DPM décrits précédemment avec la lignée *C316*. Malheureusement, un co-marquage était impossible, l'anticorps anti-Amnesiac (exprimé dans les DPM) n'étant pas disponible. Le seul moyen à notre disposition a donc été une co-expression des deux pilotes d'expression *NP677* et *C316*. Dans les mouches, *C316/+ ; NP677/UAS-CD8 :: GFP*, un seul corps cellulaire est visible, indiquant que les deux *Gal4* sont bien exprimés dans les mêmes neurones (**Fig.37**).

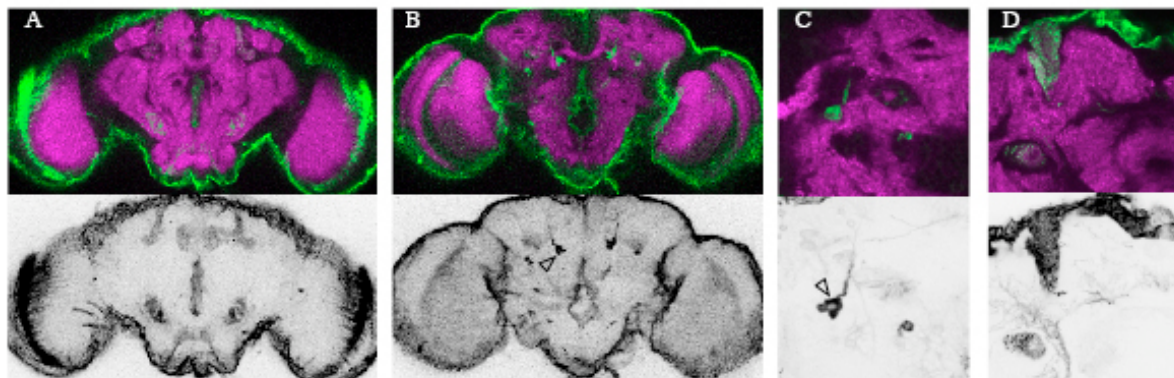


Figure 37 : Les lignées C316 et NP677 marquent les neurones DPM.

Les cerveaux de mouches *C316/+ ; NP677/UAS-CD8 ::GFP* sont analysés par microscopie confocale à l'aide d'un anticorps anti-GFP (en vert sur les images du haut, en gris sur celles du bas). Le neuropile est marqué par un anticorps anti-synapsine (violet en haut). A-B : vue frontale du cerveau au niveau des lobes des CPs (A) et des corps cellulaires des DPM (B, pointe de flèche). C-D: zoom au niveau du corps cellulaire (C) et des lobes verticaux des CPs (D).

2.3.2 La neurotransmission des neurones DPM est requise pendant le rappel de la mémoire à long terme.

Afin de vérifier les résultats obtenus lors du crible (Cf. partie précédente), les deux pilotes d'expression *NP677* et *C316* ont été utilisés. Après un protocole long, les mouches présentent un défaut de MLT lorsque la neurotransmission des neurones DPM est bloquée pendant le rappel à l'aide de *Shi^{ts}* (**Fig. 38**). Lorsque les mouches sont testées à température permissive, aucun effet n'est visible sur la MLT, indiquant que c'est effectivement le blocage de la neurotransmission et non pas la combinaison de deux lignées transgéniques hétérozygotes qui joue un rôle dans le rappel de la MLT (**Fig. 39**).

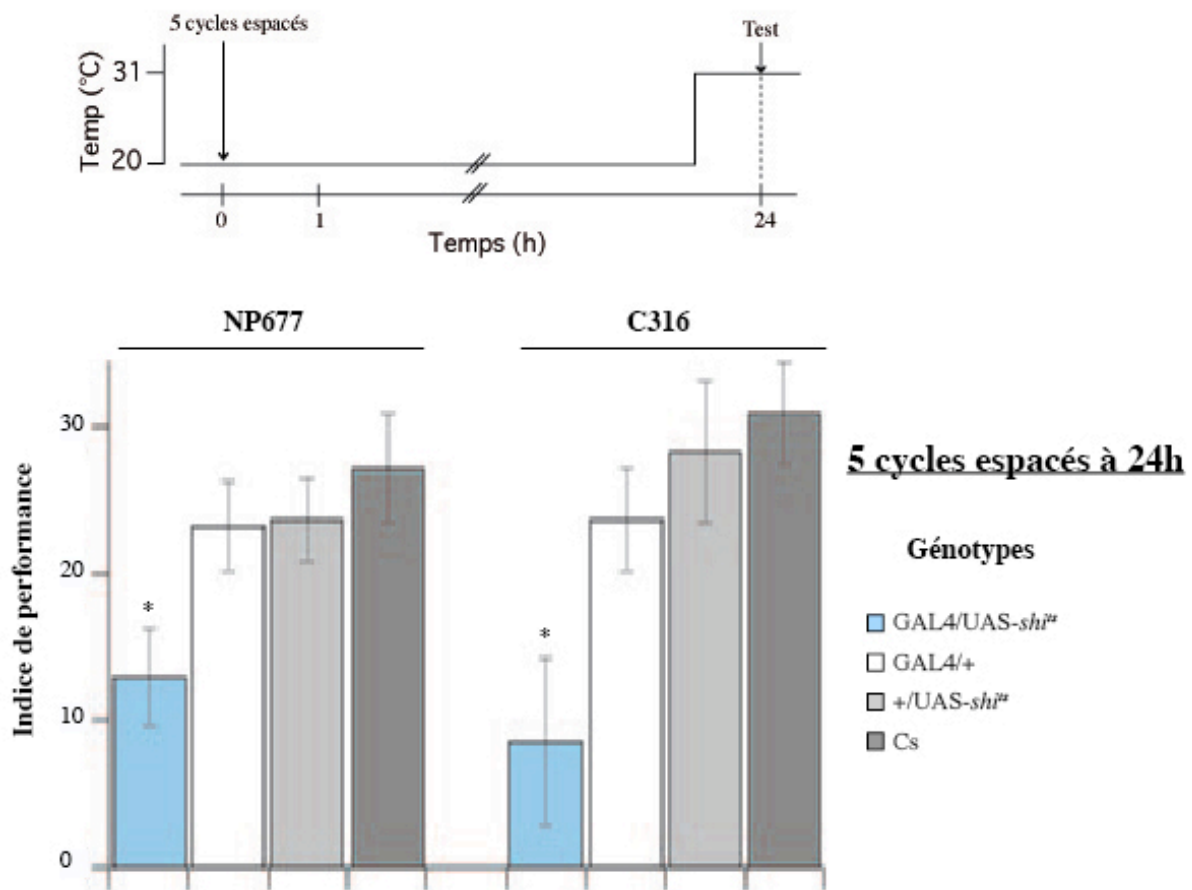


Figure 38 : Un défaut de MLT est observé lorsque la neurotransmission des neurones DPM est bloquée pendant le rappel.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les astérisques indiquent une différence significative avec les contrôles appropriés. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Une différence significative est révélée par un test de Student entre les génotypes *NP677/UAS-shi^{ts}* et *NP677/+* ($P= 0.045$), *+/ UAS-shi^{ts}* ($P= 0.041$) et *Cs* ($P= 0.022$). Une différence significative est révélée par un test de Student entre les génotypes *C316/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *C316/+* ($P= 0.038$), *+/ UAS-shi^{ts}* ($P= 0.016$) et *Cs* ($P= 0.004$). $n \geq 11$ pour tous les génotypes.

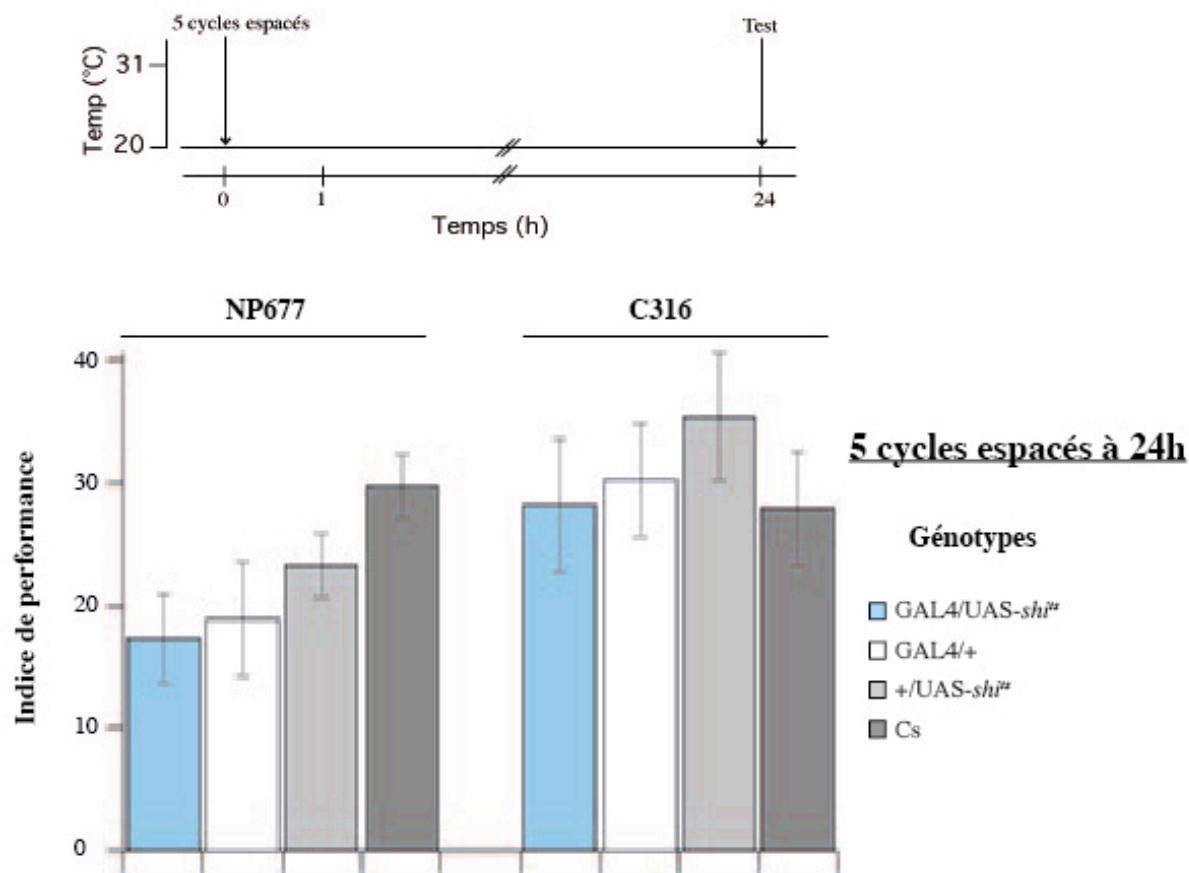


Figure 39 : La MLT est normale lorsque les neurones DPM ne sont pas bloqués pendant le test.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les mouches sont conditionnées, stockées et testées à température permissive. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student, mis à part entre NP677/UAS-*shi*^{ts} et Cs ($P=0.047$). $n \geq 8$ pour tous les génotypes.

2.3.3 La neurotransmission des neurones DPM n'est pas requise pendant le rappel de la mémoire résistante à l'anesthésie et de la mémoire à moyen terme.

La neurotransmission des neurones DPM étant requise pendant le rappel de la MLT, nous avons voulu savoir si ces neurones jouaient également un rôle sur le rappel de l'autre forme de mémoire consolidée, la MRA. Après un protocole massé, le blocage des DPM à l'aide de *Shi*^{ts} pendant le rappel n'a pas d'effet sur la MRA (**Fig. 40**).

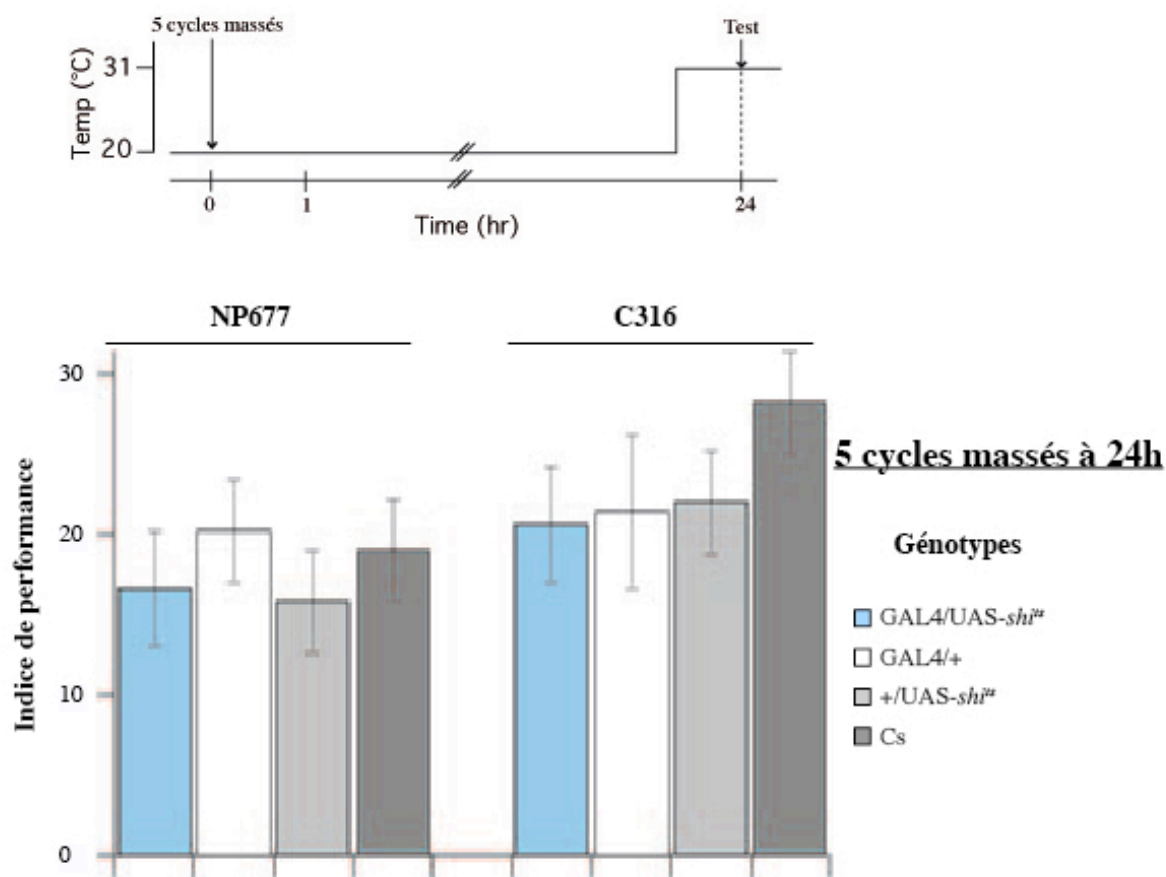


Figure 40 : La MRA est normale lorsque les neurones DPM sont bloqués pendant le test.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole massé. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student. $n \geq 10$ pour tous les génotypes.

Après un cycle de conditionnement, la seule mémoire résiduelle à 24 heures est la MRA, les mémoires labiles MCT et MMT n'étant plus présentes et la formation de MLT nécessitant un conditionnement multiple espacé. Après un cycle de conditionnement, la mémoire à 24 heures est normale lorsque les neurones DPM sont bloqués pendant le rappel (Fig. 41), confirmant que la neurotransmission de ces neurones n'est pas requise pour la restitution de la MRA.

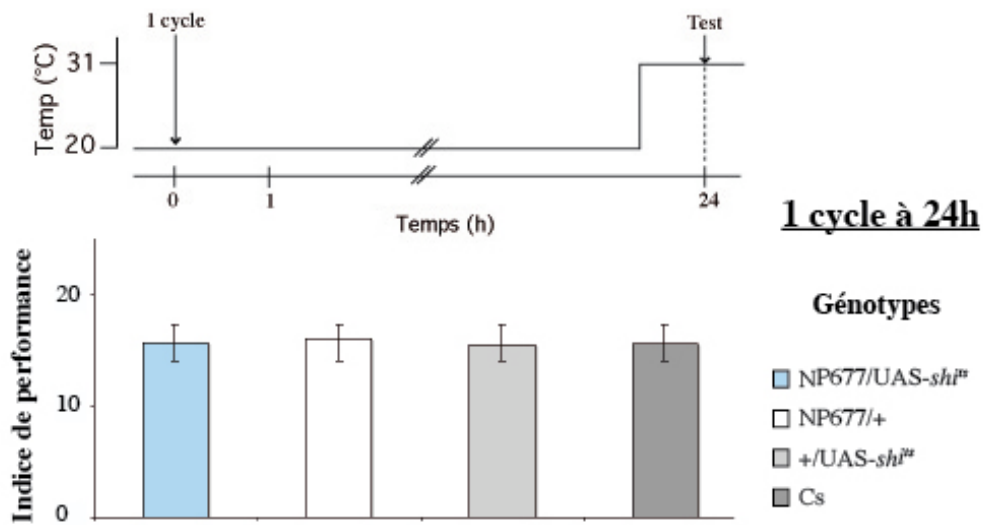


Figure 41 : La restitution de la MRA à 24 heures ne requiert pas la neurotransmission des neurones DPM après un cycle de conditionnement.

Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student. N= 20 pour tous les génotypes.

Une précédente étude utilisant le pilote d'expression *C316* a permis de montrer que la neurotransmission de neurones DPM n'est pas requise pendant le rappel de la mémoire olfactive avertisse à 2 heures (Keene et al., 2006; Keene et al., 2004). Nous avons voulu vérifier qu'un résultat similaire est obtenu avec la lignée *NP677*. Après un cycle de conditionnement, le blocage des neurones DPM dans les mouches *NP677/UAS-shi^{ts}* n'a pas d'effet sur la restitution de la mémoire à 2 heures (Fig. 42).

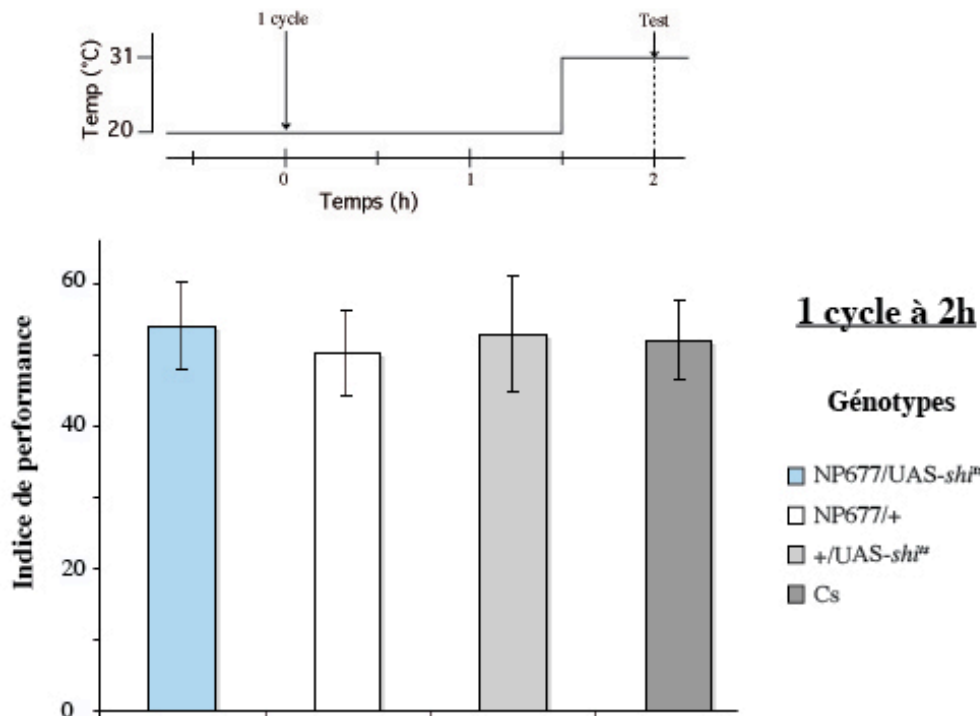


Figure 42 : La mémoire à 2 heures est normale lorsque les neurones DPM sont bloqués pendant le test.

Les indices de performance sont calculés à 2h après un protocole court. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student. n= 8 pour tous les génotypes.

2.3.4 Le gène *delta* ne semble pas impliqué dans la formation de la MLT

Dans la lignée *NP677*, l'élément P est inséré dans le premier intron du gène *Delta*, 5kb en aval du début du premier exon. Le gène *Delta* code un récepteur transmembranaire impliqué dans un grand nombre de mécanismes développementaux mais est surtout connu pour interagir avec Notch, une protéine impliquée dans la formation de la MLT (Ge et al., 2004; Presente et al., 2004). La lignée *NP677* est létale à l'état homozygote et les mouches hétérozygotes *NP677/+* ne présentent aucun défaut de mémoire comparée aux mouches *Cs*, ni pour la mémoire 2 h (**Fig. 42**), ni pour la MRA (**Fig. 40 et 41**), ni pour la MLT (**Fig. 38 et 39**). Afin de déterminer si le gène *Delta* joue un rôle physiologique dans la formation de la MLT, nous avons donc utilisé le pilote d'expression *elav-Switch* afin d'exprimer un ARNi (3720, VDRC, Autriche) de *Delta* dans tous les neurones, le lieu d'expression de *Delta* n'étant pas connu chez l'adulte.

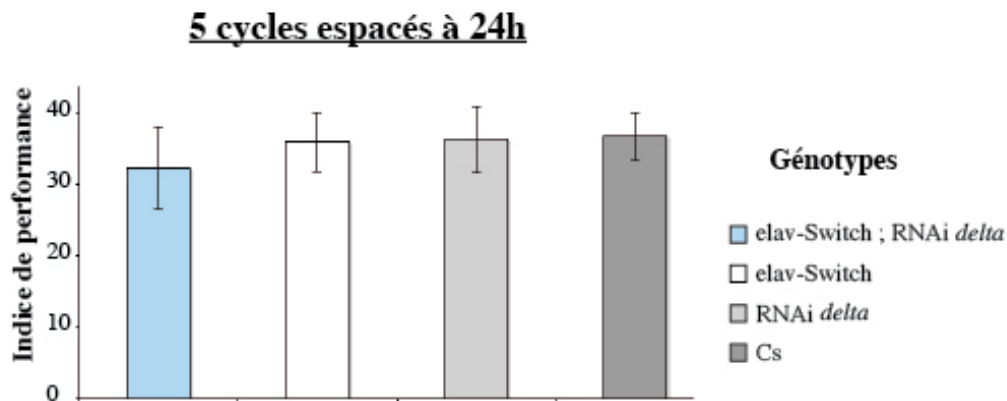


Figure 43 : La MLT est normale lorsque le gène *Delta* est inhibé dans tous les neurones d'une mouche adulte.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student. n= 8 pour tous les génotypes.

Après un protocole long, la MLT des mouches *elav-Switch ; RNAi Delta* n'est pas significativement différente de celle des contrôles (**Fig. 43**). Ces résultats suggèrent que *Delta* n'aurait pas de rôle physiologique dans les neurones pour la formation de la MLT ou que l'ARNi n'est pas fonctionnel. Néanmoins, il est possible la lignée *NP677* ne reflète pas le profil d'expression du gène *Delta* qui pourrait être exprimé ailleurs que dans les neurones, notamment dans les cellules gliales. Vu l'importance du gène *Delta* tout au long du développement, il faudrait pouvoir réprimer l'expression du gène uniquement au stade adulte dans les cellules gliales. Malheureusement, cette expérience n'est pas réalisable pour le moment aucun pilote d'expression ne satisfaisant ces conditions.

2.3.5 Conclusion

Un nouveau rôle a été découvert pour les neurones DPM dont la fonction dans la consolidation de la mémoire a déjà été décrite (Keene et al., 2006; Keene et al., 2004). La neurotransmission des neurones DPM est en effet requise pendant le rappel de la mémoire à long terme mais pas pour le rappel des mémoires à moyen terme et résistante à l'anesthésie.

De nouvelles expériences sont en cours afin de déterminer quelles projections sont importantes dans ce mécanisme. En effet, la surexpression de la protéine *DScam 17.2 :: GFP* dans les neurones DPM affecte leur développement et seule la branche innervant les lobes α'/β' des CPs est présente chez l'adulte. La combinaison du transgène *UAS-DScam 17.2 :: GFP* et d'un *UAS-shi^{ts}* devrait donc nous permettre de déterminer si ce sont les projections des neurones DPM sur les lobes α/β ou sur les lobes α'/β' qui sont requises pour le rappel de la MLT. Une fois cette expérience réalisée, ce travail devrait faire l'objet d'une publication.

2.4 Les neurones marqués dans les lignées *MZ0604* et *NP689* sont impliqués dans la mémoire aversive

Les deux lignées *MZ0604* et *NP689* ont été étudiées en parallèle et présentent des résultats similaires. Ainsi, pour des raisons pratiques, les résultats seront traités dans une même partie, bien que les profils d'expression de ces deux lignées soient différents.

2.4.1 Profil d'expression des lignées *MZ0604* et *NP689*

Les neurones extrinsèques aux CPs marqués dans la lignée *MZ0604* sont les neurones MB-MV1 décrits par Tanaka et al (**Fig. 44-A et B**). Le corps cellulaire (symétrique dans chaque hémisphère) est situé dans le protocérébrum postérieur inféro-latéral (pilpr), ventralement et latéralement aux calices. Les projections partent antérieurement du corps cellulaire (1) et bifurquent au niveau du protocérébrum antérieur inféro-médial (aimpr) pour former deux branches (2 et 3). La première passe ventralement et se termine dans le protocérébrum ventro-médial (vmpr, 2). La seconde bifurque à proximité des lobes β' (3), formant une branche qui passe médialement dans l'hémisphère contra-latéral (4) et une autre qui arborise au niveau du lobe α' et de la base du lobe γ (5). Les neurones MB-MV1 co-localisent avec un anticorps anti-TH, suggérant que ces neurones sont dopaminergiques (Tanimoto et al., données non publiées). D'autres neurones sont également marqués dans cette lignée, comme le complexe central (**Fig. 44-C**) et le pont protocérébral (**Fig. 44-D**).

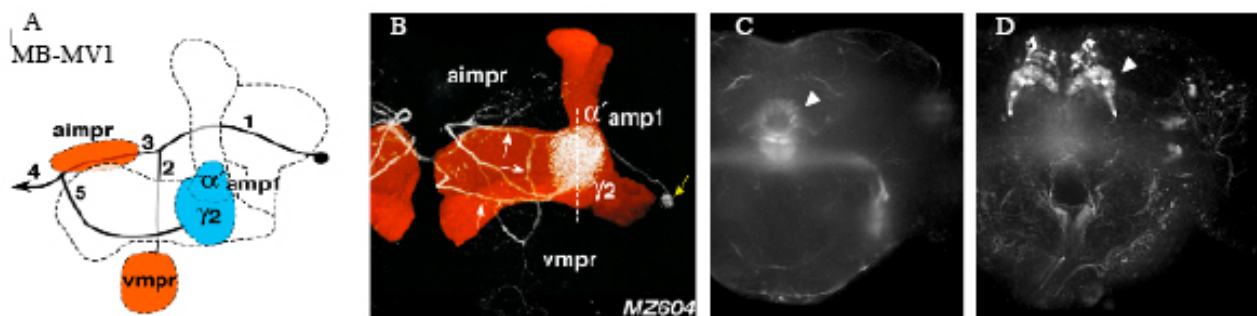


Figure 44 : Profil d'expression de la lignée MZ0604.

A : Représentation schématique de l'arborisation des neurones MB-MV1. Le point noir matérialise le corps cellulaire, les traits noirs indiquent la trajectoire des fibres. Les zones oranges et bleue représentent les zones de projection à l'extérieur et à l'intérieur des CPs. B : Reconstruction frontale de la région des lobes avec les neurones MB-MV1 (en blanc) et les lobes des CPs (en orange, marqués par un anticorps ant-nc82). Les flèches blanches indiquent des fibres extérieures aux CPs et la flèche jaune le corps cellulaire. C et D : vue frontale par microscopie confocale de cerveaux *MZ0604/UAS-mCD8::GFP* au niveau du protocérébrum médian (C) et postérieur (D). Les pointes de flèche indiquent le corps en ellipse (C) et le pont protocérébral (D). Tanaka et al., 2008.

Dans la lignée *NP689*, deux types de neurones extrinsèques sont marqués : MB-V3 et MB-V4 (**Fig. 45-A et -B**).

Les corps cellulaires des neurones MB-V3 (deux dans chaque hémisphère) et V4 (un dans chaque hémisphère) sont situés dans la zone la plus dorsale du ganglion sous-oesophagien, ventro-médialement aux lobes antennaires. Ils projettent dorsalement jusqu'au niveau du lobe γ . Les projections des neurones MB-V3 partent dorso-latéralement et forment deux branches. La première arborise sur toute la surface de la pointe du lobe α . La seconde arborise tout d'abord dans le protocérébrum antérieur supéro-médial (*asmpr*) puis dans le protocérébrum postérieur supéro-médial (*psmpr*), à proximité des calices, avant de finir dans le protocérébrum médian supéro-médial (*msmpr*). Au niveau du lobe γ , les projections de neurones MB-V4 tournent latéralement et arborisent dans le protocérébrum antérieur inféro-médial (*aimpr*) puis dans le protocérébrum médian supéro-médial (*msmpr*), postérieurement aux lobes verticaux. Les projections partent ensuite en direction des lobes verticaux des CPs et arborisent intensément dans la partie médiane du lobe α' . Il est possible que les neurones MB-V3 et MB-V4 soient inter-connectés, une fine branche étant détectée occasionnellement au niveau de la bifurcation des projections. Des neurones projetant sur le complexe central sont également marqués dans cette lignée (**Fig. 45-C et -D**)

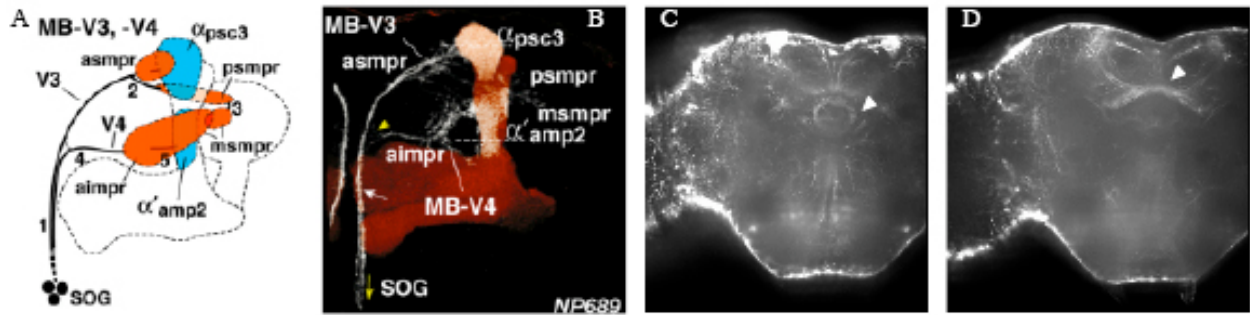


Figure 45 : Profil d'expression de la lignée NP689.

A : Représentation schématique de l'arborisation des neurones MB-V3 et V4. Le point noir matérialise le corps cellulaire, les traits noirs indiquent la trajectoire des fibres. Les zones oranges et bleues représentent les zones de projection à l'extérieur et à l'intérieur des CPs. B : Reconstruction frontale de la région des lobes avec les neurones MB-MV1 (en blanc) et les lobes des CPs (en orange, marqués par un anticorps ant-nc82). Les flèches blanches indiquent des fibres extérieures aux CPs et la flèche jaune la position des corps cellulaires. C et D : vue frontale par microscopie confocale de cerveaux *MZ0604/UAS-mCD8::GFP* au niveau du protocérébrum médian. Les pointes de flèche indiquent le corps en ellipse (C) et le corps en éventail (D).

2.4.2 Les neurones marqués dans MZ0604 et NP689 sont impliqués dans le rappel de la MLT

Après homogénéisation du fonds génétique, les lignées *NP689* et *MZ0604* ont été re-testées avec les contrôles appropriés.

Après un conditionnement espacé, le blocage de la neurotransmission à l'aide du transgène *UAS-shi^{ts}* des neurones marqués dans les lignées *NP689* et *MZ0604* pendant le rappel induit un défaut de MLT à 24 heures (**Fig. 46**). Lorsque les mouches sont testées à température permissive, la MLT est normale (**Fig. 47**).

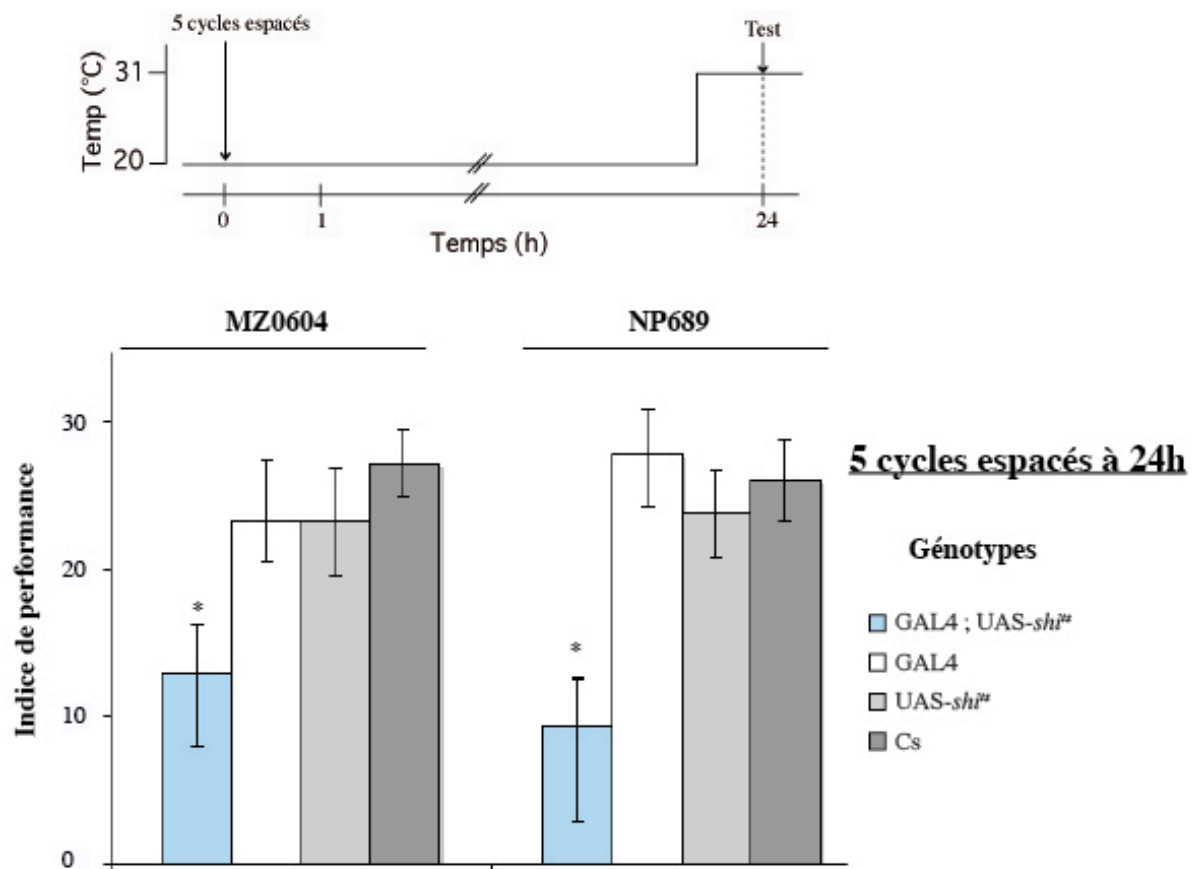


Figure 46 : Le blocage de la neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 pendant le rappel induit un défaut de MLT.

Les indices de performance sont calculés à 24 heures après un protocole long. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Une différence significative est détectée avec un test de Student entre les mouches *MZ0604/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *MZ0604/+* ($P < 0.05$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) et Cs ($P < 0.05$). Une différence significative est détectée avec un test de Student entre les mouches *NP689/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *NP689/+* ($P < 0.05$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.05$) et Cs ($P < 0.05$). $n = 12$ pour tous les génotypes.

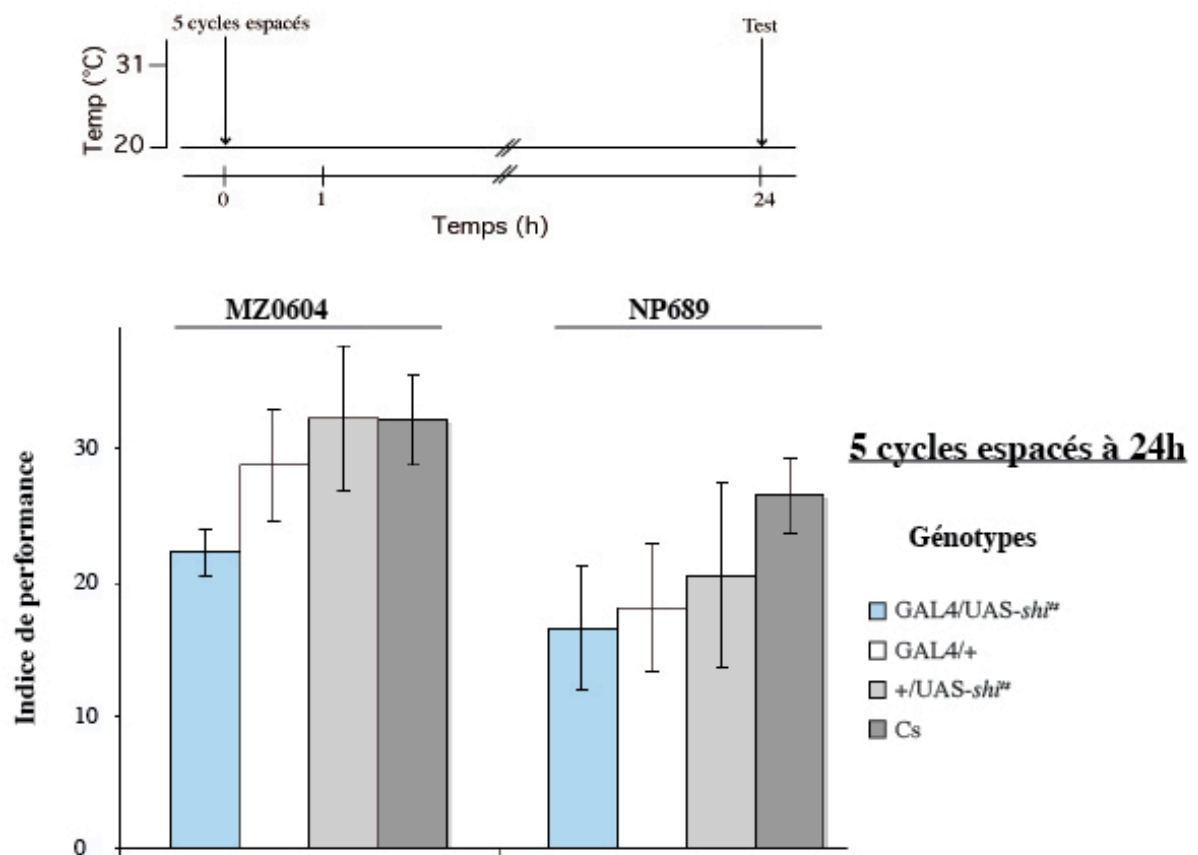


Figure 47 : La MLT est normale lorsque les neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 ne sont pas bloqués pendant le test.

Les indices de performance sont calculés à 24h après un protocole long. Les mouches sont conditionnées, stockées et testées à température permissive. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student mis à part entre *MZ0604/+* ; *+/UAS-shi[#]* et Cs ($P < 0.05$). $n \geq 8$ pour tous les génotypes.

2.4.3 Les neurones marqués dans *MZ0604* et *NP689* sont impliqués dans le rappel de la MRA

Nous avons ensuite voulu savoir si les neurones marqués dans les lignées *MZ604* et *NP689* sont également requis pour la formation et la restitution de la MRA. Le blocage de ces neurones pendant le rappel après un protocole massé induit un défaut de mémoire à 24 heures, suggérant qu'ils sont effectivement requis pendant le rappel (Fig.48).

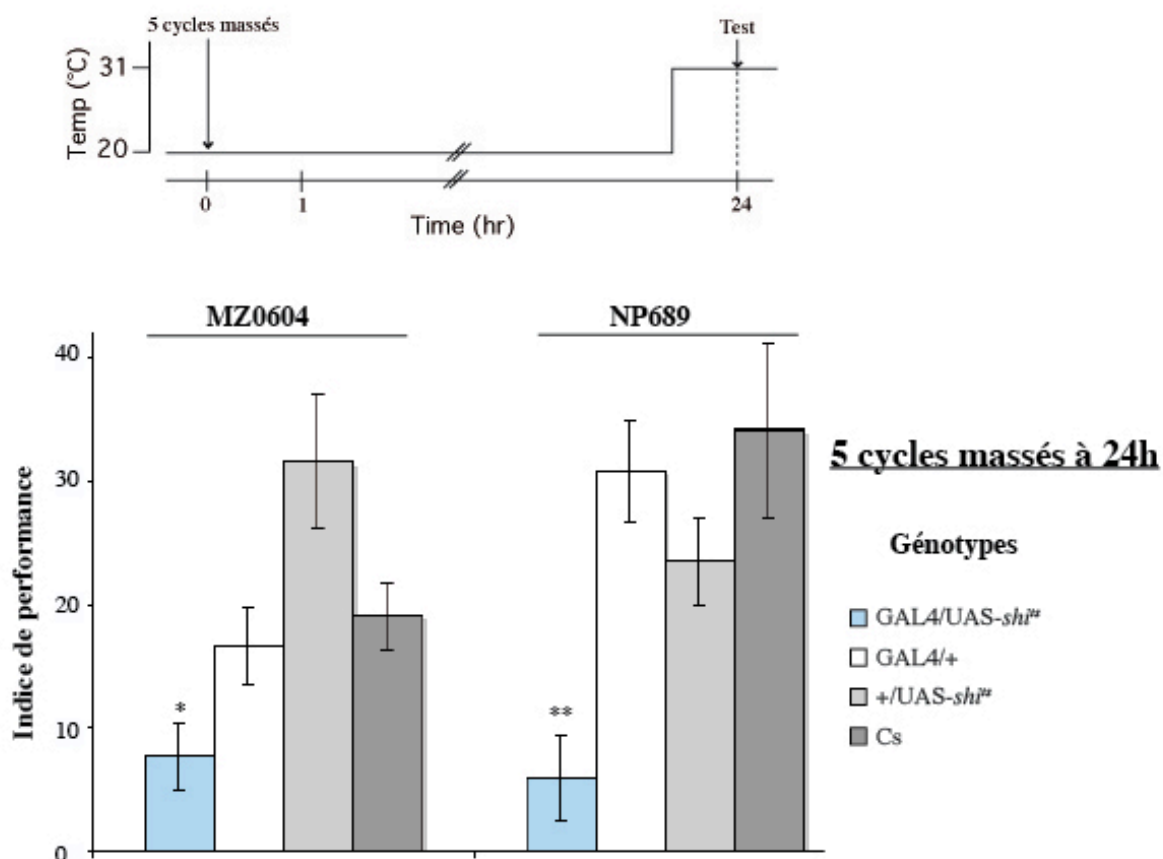


Figure 48 : Le blocage de la neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 pendant le rappel induit un défaut de MRA.

Les indices de performance sont calculés à 24 heures après un protocole massé. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Une différence significative est détectée avec un test de Student entre les mouches *MZ0604/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *MZ0604/+* ($P < 0.05$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.01$) et Cs ($P < 0.01$). Une différence significative est détectée avec un test de Student entre les mouches *NP689/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *NP689/+* ($P < 0.0001$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.01$) et Cs ($P < 0.01$). $n = 12$ pour tous les génotypes.

2.4.4 Les neurones marqués dans la lignée *NP689* sont impliqués pendant un apprentissage massé

Le blocage des neurones *MZ0604* uniquement pendant un conditionnement massé n'induit pas de défaut de mémoire à 24 heures, suggérant que les neurones MB-MV1 ne sont pas requis pendant l'apprentissage (Figure X). A l'opposé, une chute de mémoire est observée à 24 heures lorsque les neurones *NP689* sont bloqués pendant le conditionnement (Fig. 49).

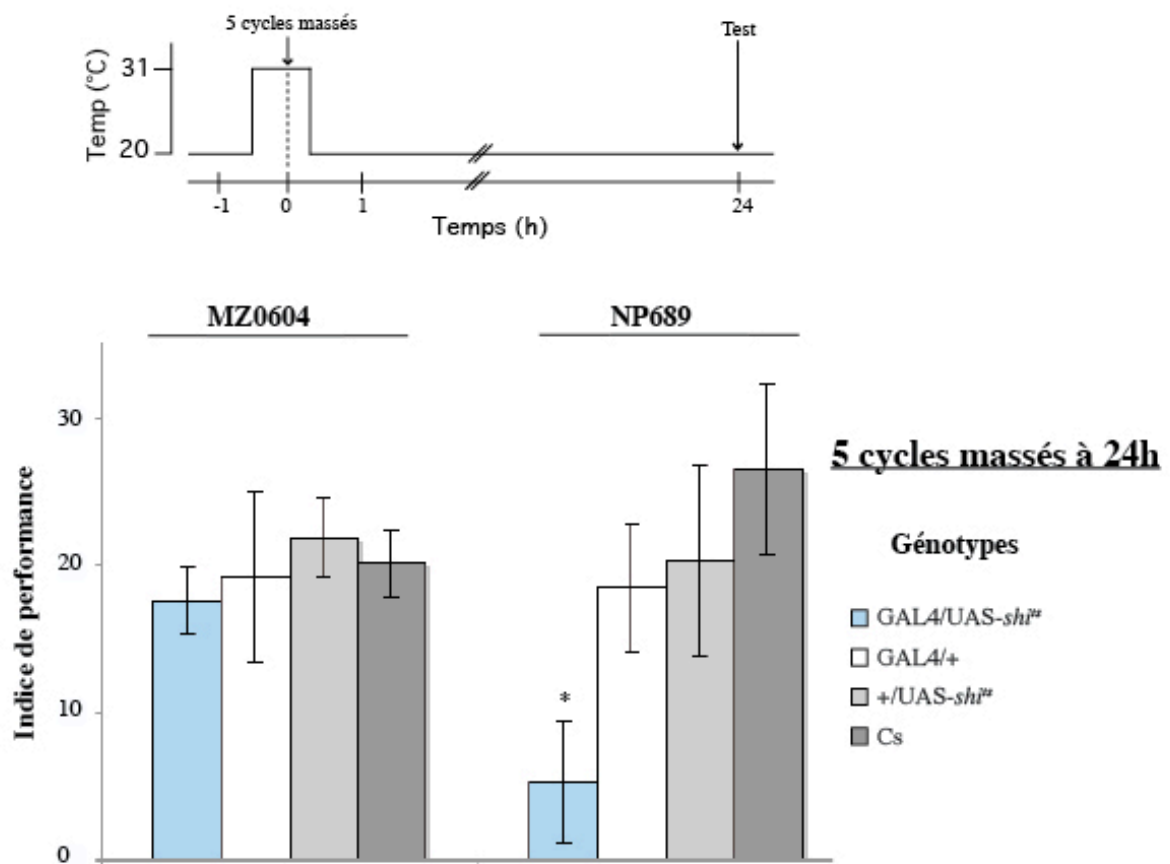


Figure 49 : La neurotransmission des neurones MB-V3/V4 est requise pendant l'apprentissage.

Les indices de performance sont calculés à 24 heures après un protocole massé. Les mouches sont conditionnées à température restrictive puis transférées et maintenues à température permissive pendant la consolidation et le test. Aucune différence significative n'est détectée avec un test de Student entre *MZ0604/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *MZ0604/+* ($P=0.778$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P<0.204$) et Cs ($P<0.409$). Une différence significative est détectée avec un test de Student entre les mouches *NP689/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *NP689/+* ($P=0.032$), *+/UAS-shi^{ts}* ($P=0.044$) et Cs ($P=0.005$). $n=8$ pour *MZ0604/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et les contrôles appropriés et $n=11$ avec *NP689*.

2.4.5 Le blocages des neurones marqués dans *MZ0604* et *NP689* n'affecte pas la mémoire à 2 heures

Enfin, nous avons enfin voulu savoir si les neurones *MZ0604* et *NP689* jouaient un rôle dans la formation, la consolidation ou le rappel de mémoires plus précoces.

Aucune chute de mémoire n'est observée à 2 heures lorsque les neurones sont bloqués pendant le rappel après un protocole court (**Fig. 50**). Qui plus est, après un protocole court, le blocage des neurones *MZ0604* et *NP689* tout au long du temps, n'a pas d'effet sur la mémoire à 2 heures (**Fig.**

51). Ces résultats indiquent donc que la signalisation de ces neurones n'est requise ni pour la formation, ni pour la consolidation, ni le rappel des mémoires à court terme et à moyen terme.

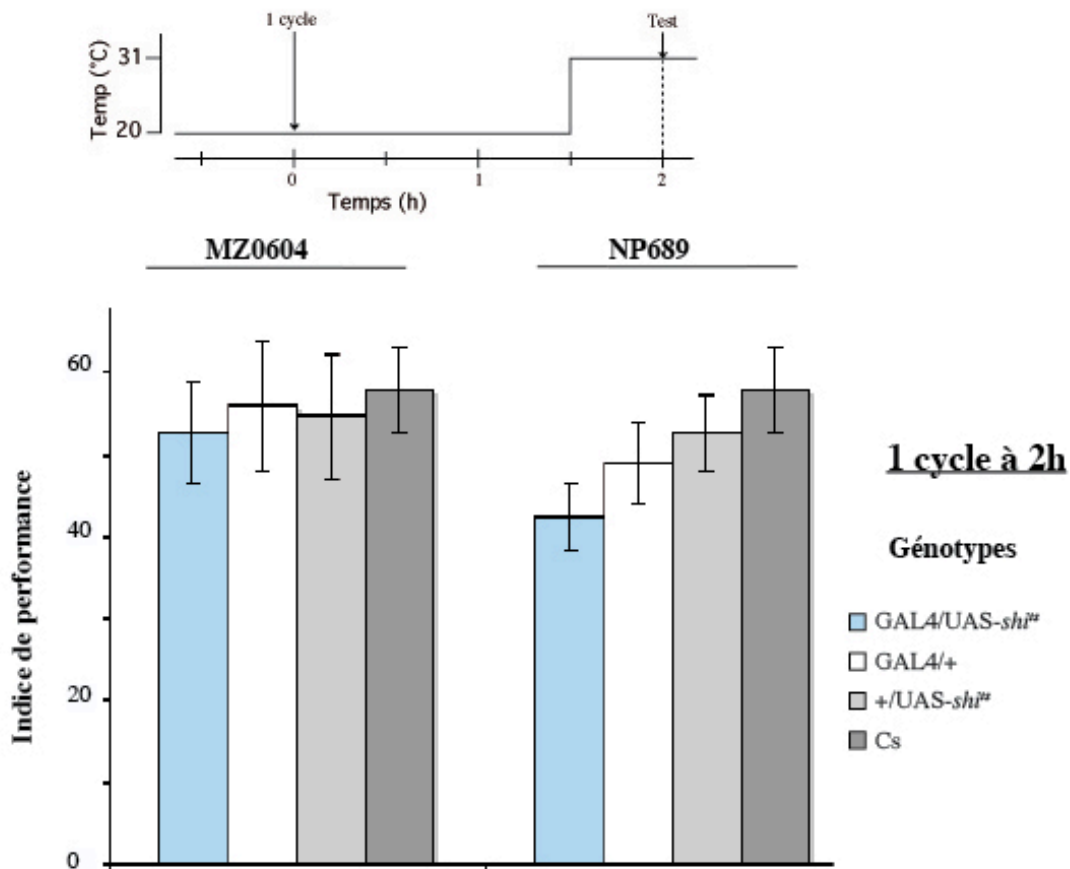


Figure 50 : La neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 n'est pas requise pour le rappel de la mémoire à 2h.

Les indices de performance sont calculés à 2h après un protocole court. Les mouches sont conditionnées et stockées à température permissive puis transférées à température restrictive pour le test. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student mis à part entre NP689/+ ; +/UAS-*shi*^{ts} et Cs ($P < 0.05$). $n \geq 8$ pour tous les génotypes.

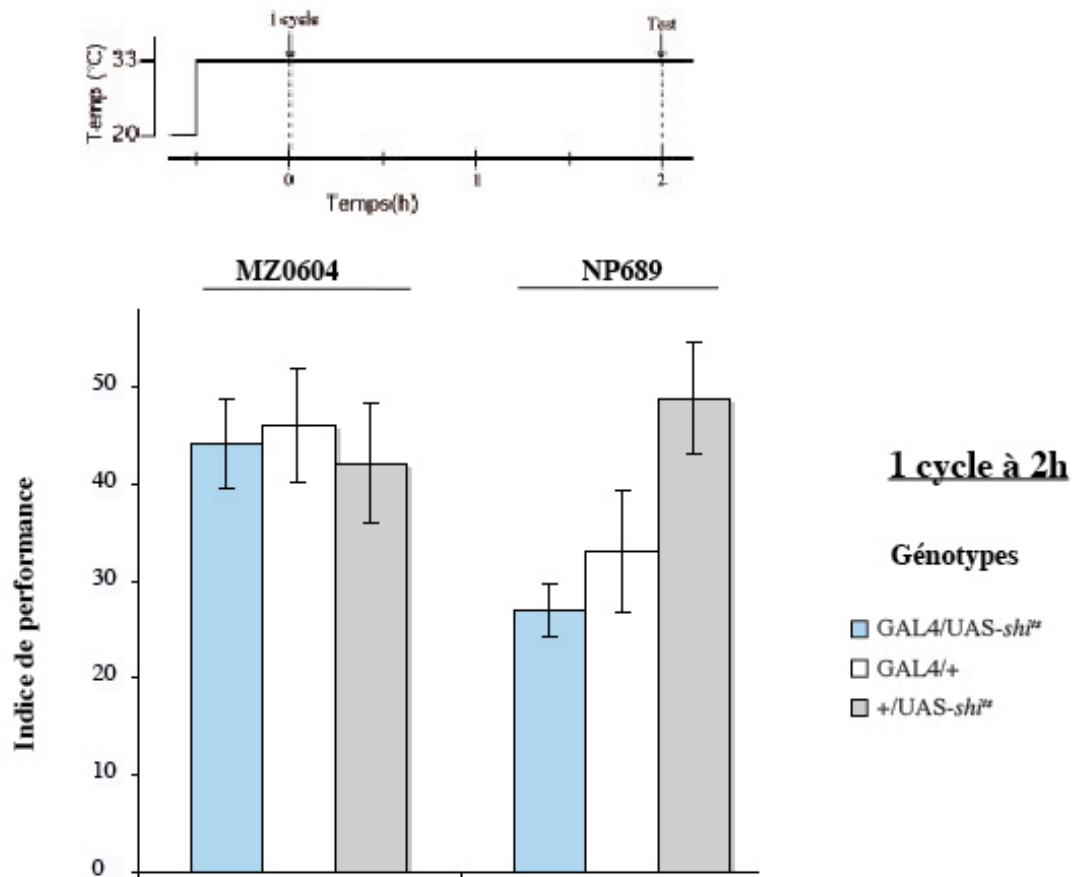


Figure 51 : La neurotransmission des neurones MB-MV1 et MB-V3/V4 n'est pas requise pendant l'apprentissage.

La consolidation ou le rappel de la mémoire à 2h. Les indices de performance sont calculés à 2h après un protocole court. Les mouches sont conditionnées, stockées et testées à température restrictive. Aucune différence significative n'est détectée par un test de Student mis à part entre *NP689/+ ; +/UAS-shi^{ts}* et *+/UAS-shi^{ts}* ($P < 0.01$). $n \geq 8$ pour tous les génotypes.

Discussion

1 Réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire olfactive.

Quelles sont les structures et réseaux neuronaux impliqués dans la formation, la consolidation et le rappel des différents types de mémoire ? Chez la drosophile, les corps pédonculés sont le centre de la mémoire olfactive aversive (de Belle and Heisenberg, 1994). Les CPs reçoivent des afférences des neurones de projections qui transmettent l'information olfactive en provenance des lobes antennaires (Jefferis et al., 2007; Stocker et al., 1997; Vosshall et al., 2000), et des afférences de neurones dopaminergiques, impliqués dans la transmission du stimulus inconditionnel aversif (chocs électriques) (Riemensperger et al., 2005; Schwaerzel et al., 2003). Les corps pédonculés sont constitués de plusieurs types de neurones ayant des rôles différents dans la formation, la consolidation ou le rappel. Ainsi, la première trace mnésique est détectée dans les neurones α'/β' (Wang et al., 2008) et ceux-ci jouent un rôle dès l'apprentissage (Krashes et al., 2007). Seule la neurotransmission des neurones α'/β' des CPs est requise pendant la consolidation mais cela ne signifie pas pour autant que les autres types neuronaux des CPs ne jouent pas un rôle dans la consolidation.

Différents types de cellules de Kenyon sont requis pendant le rappel de la mémoire olfactive aversive. La neurotransmission des neurones α/β est requise pour le rappel des mémoires à 3 minutes (McGuire et al., 2001), celle des α/β et γ pour les mémoires à 2 et 3 heures (Dubnau et al., 2001; Isabel et al., 2004; McGuire et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002) et celle des α/β pour la MRA et la MLT (Isabel et al., 2004). La MLT étant abolie dans le mutant *ala* sans lobes verticaux α/α' (Pascual and Preat, 2001), il en a été conclu que la trace mnésique de la MLT est localisée spécifiquement dans les lobes α . Cette interprétation a été confirmée par l'imagerie calcique *in vivo* puisqu'une trace mnésique est détectée à long terme dans la branche α des CPs (Yu et al., 2006). Ainsi, la spécificité des différents types de neurones des CPs commence à être relativement bien caractérisée après apprentissage. On peut néanmoins se demander quels neurones sont impliqués dans la sortie de la trace mnésique des CPs pendant le test et existe-t-il d'autres neurones spécifiques à la formation d'un type de mémoire ?

Le crible de neurones extrinsèques réalisé pendant ma thèse avait pour but l'identification de nouveaux réseaux de neurones pouvant jouer un rôle dans la dynamique de la mémoire olfactive chez la drosophile, et notamment dans le rappel de la MLT aversive. Plusieurs nouveaux réseaux neuronaux importants pour le rappel de la MLT aversive ont été identifiés. Certains de ces neurones sont connectés uniquement aux lobes verticaux des CPs (NP2492 et MZ160 pour les neurones MB-V2, NP689 pour les neurones MB-V3) alors que d'autres sont connectés aussi bien aux lobes verticaux qu'aux lobes médians (MZ0604 pour MB-MV1 et NP677 et C316 pour les DPM). Ainsi, tous les réseaux de neurones identifiés sont connectés aux lobes verticaux, siège de la MLT. Certains de ces neurones sont afférents aux CPs (MB-MV1 et DPM) et pourraient jouer un rôle dans la réactivation de la trace mnésique à long terme alors que d'autres sont efférents et participeraient à la sortie de l'information des CPs lors du test.

1.1 Les neurones MB-V2 sont impliqués dans le rappel de la mémoire aversive

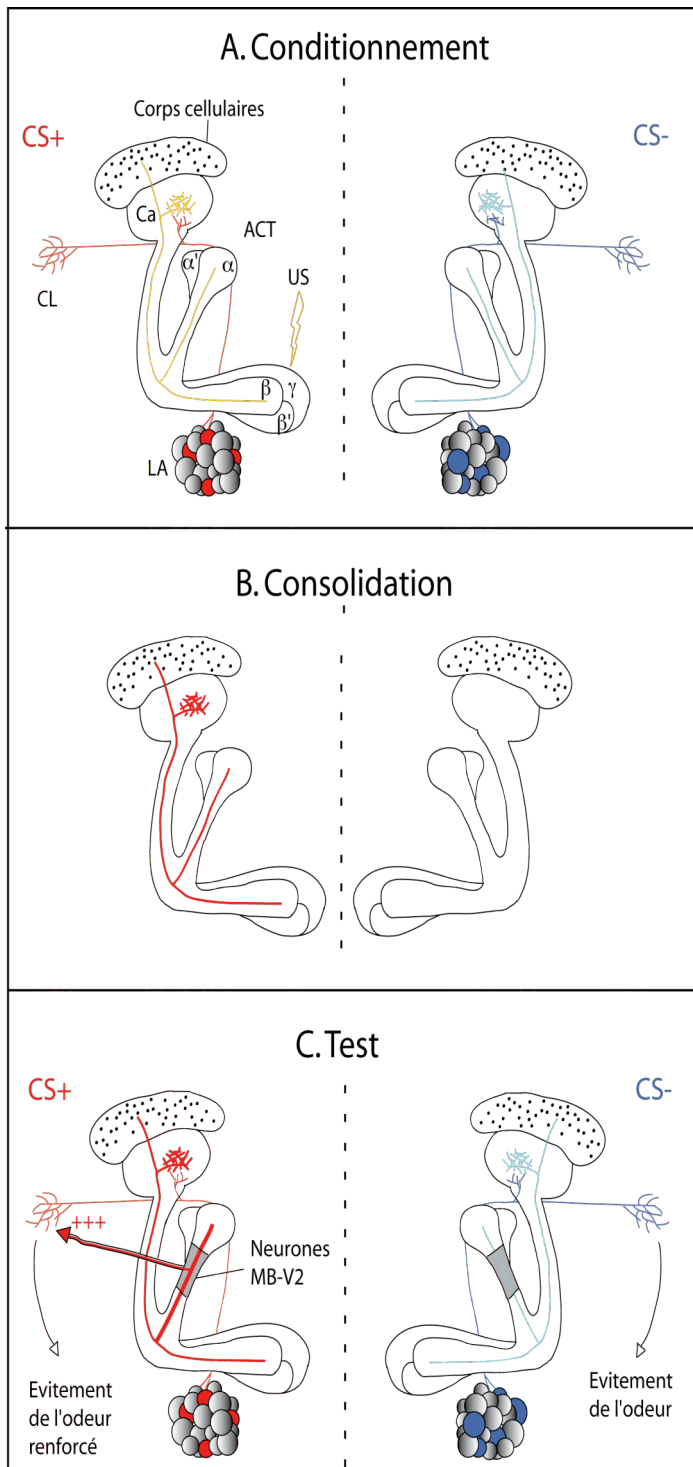
Le crible de lignées Gal4 extrinsèques aux CPs a permis l'identification de nouveaux réseaux neuronaux impliqués dans le rappel de la MLT. La neurotransmission des neurones MB-V2 est requise aussi bien pour la restitution des mémoires précoces que tardives, mais pas pendant l'apprentissage, ni la consolidation (**Fig. 2 et 3**, p. 119-122). Ainsi, bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation des deux formes de mémoires consolidées soient différents, une partie des réseaux neuronaux requis pour la mémoire olfactive sont communs. Les neurones MB-V2 sont efférents aux lobes verticaux des CPs et sont connectés soit aux neurones α (MB-V2 α), soit aux neurones α' (MB-V2 α') (**Fig. 1 et 4**, p. 117-118, 123-124). Le blocage de la sortie des lobes α' pendant le rappel de la mémoire à 3 heures n'ayant pas d'effet (Krashes et al., 2007), il est vraisemblable que le défaut observé à 2 heures lorsque l'on bloque les MB-V2 soit lié à un défaut de neurotransmission des lobes α . Ainsi, ce serait la branche MB-V2 α qui jouerait un rôle dans la sortie de l'information des CPs pendant le rappel de la MCT et de la MMT. Néanmoins, on peut envisager que pendant l'apprentissage ou la phase précoce de la consolidation, les lobes α' puissent activer les neurones MB-V2 α' . Bien qu'aucune trace mnésique n'ait été détectée à court terme ou moyen terme dans les lobes α (Yu et al., 2005), soit pour des raisons techniques liées aux limites des techniques d'imagerie calcique, soit parce qu'elle est simplement absente, les résultats obtenus pendant ma thèse suggèrent que ceux-ci jouent néanmoins un rôle important dans le rappel des différents types de mémoire.

Le blocage des neurones MB-V2 lors du test via les pilotes d'expression NP2492 et MZ160 entraîne une chute significative du rappel de toutes les formes de mémoire olfactive aversive.

Toutefois le rappel n'est jamais complètement aboli (**Fig. 2-3**, p. 119-122). Trois hypothèses non exclusives peuvent expliquer ce résultat: 1) la neurotransmission ne serait pas totalement bloquée par l'expression du transgène *shi^{ts}* à 33°C dans les neurones MB-V2 2) tous les neurones MB-V2 ne seraient pas marqués dans les lignées NP2492 et MZ160 3) d'autres neurones de sortie des CPs joueraient un rôle dans le rappel des mémoires olfactives aversives. Dans ce cadre il serait intéressant de bloquer simultanément les neurones de ces deux lignées afin d'augmenter éventuellement la population de MB-V2 ciblés.

Chez les mouches sauvages conditionnées, comment l'activité des neurones MB-V2 permet-elle d'éviter lors du test l'odeur qui représente un danger potentiel ? Les neurones MB-V2 sont efférents aux CPs et projettent sur la corne latérale. Comme indiqué précédemment (cf. introduction, 2.1.3), la corne latérale reçoit des afférences des lobes antennaires par les neurones de projection et est impliquée dans la réponse aux odeurs aversives chez les mouches naïves (Wang et al. 2003). Pendant le conditionnement, les deux odeurs sont présentées successivement (**Fig. 52-A**). La détection de coïncidence entre l'odeur CS+ et les chocs électriques permet la formation d'une trace mnésique odeur-dépendante dans certaines cellules des corps pédonculés, d'abord dans les neurones α'/β' (Wang et al., 2008), puis dans les neurones α/β lors d'un conditionnement espacé (Yu et al., 2006) (**Fig. 52-B**). La présentation de l'odeur CS- pendant le conditionnement active certaines cellules de Kenyon mais n'induit pas de changement d'activité durable ou de plasticité synaptique dans les neurones correspondant. Pendant le rappel, la présentation de l'odeur CS- entraîne une activation des neurones de projection et une réaction d'évitement naturel à une odeur aversive médiée par la corne latérale (**Fig. 52-C**). En présence de l'odeur CS+, en plus de l'activation des neurones de projection, la trace mnésique dans les cellules de Kenyon est réactivée. La signalisation des lobes verticaux vers les neurones MB-V2 serait donc modifiée spécifiquement en la présence de l'odeur CS+. Le niveau de base d'évitement de l'odeur CS+ serait ainsi augmenté dans les mouches conditionnées, par une stimulation simultanée des neurones intrinsèques de la corne latérale, directement par les neurones de projection, et de manière intégrée et expérience-dépendante par les neurones de sortie des corps pédonculés (Heimbeck et al., 2001). Ainsi, pendant le test, les mouches ayant une bonne mémoire choisiraient préférentiellement l'odeur CS- car la réaction d'évitement provoquée par cette odeur serait moins intense que celle provoquée par le CS+.

Figure 52: Modèle du rappel de la mémoire olfactive aversive chez *Drosophila melanogaster*



A. Pendant le conditionnement, l'odeurs CS+ est présentée simultanément avec les chocs électriques (US). Certains glomérules répondent de manière spécifique à la molécule odorante et les neurones de projection correspondant sont activés. Certaines cellules de Kenyon sont alors activées par les neurones de projection via le tractus antenno-glomérulaire. La détection de coïncidence entre les voies choc et odeur CS+ initie la formation d'une trace mnésique dans les cellules de Kenyon qui répondent à cette odeur. La présentation de la molécule odorante CS- active également certaines cellules de Kenyon mais aucun changement durable n'est induit dans ces cellules.

B. Après conditionnement, la trace mnésique formée dans les neurones CS+ est consolidée. Les neurones CS- retrouvent un niveau d'activité basal après quelque temps.

C. Pendant le test, la présentation de l'odeur CS+ réactive les mêmes glomérules que pendant le conditionnement. Une réponse aversive à l'odeur CS+ est initiée par la neurotransmission des neurones de projection au niveau de la corne latérale (CL). Simultanément, la trace mnésique dans les cellules de Kenyon est réactivée par les neurones de projection. Les neurones MB-V2 sont alors activés via les lobes α et augmentent la réponse aversive à l'odeur CS+ en déchargeant au niveau de la corne latérale. La présentation de l'odeur CS- n'induit que la réponse naïve à l'odeur répulsive médiée par les neurones de projection. les corps pédonculés n'ayant pas formé de trace mnésique spécifique à cette odeur.

Chez l'abeille les neurones PE1 pourraient jouer un rôle similaire aux MB-V2 dans la sortie de la mémoire olfactive des corps pédonculés. En effet, la réponse de ces neurones extrinsèques aux CPs diminue après un conditionnement olfactif appétitif (Mauelshagen, 1993; Okada et al., 2007). Un corps cellulaire est présent dans chaque hémisphère. Les neurones PE1 sont afférents au pédoncule des CPs, et projettent sur les lobes α et la corne latérale (Menzel and Manz, 2005) (**Fig. 53**). Au niveau de la corne latérale, les neurones PE1 projettent soit directement sur les neurones intrinsèques, soit via des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Les neurones intrinsèques de la corne latérale pourraient avoir un rôle pré-moteur chez les insectes (Li and Strausfeld, 1997). Ainsi, chez l'abeille, il a été proposé que les neurones PE1 pourraient jouer un rôle dans le rappel de mémoires olfactives via une réduction de l'inhibition des interneurons inhibiteurs (Okada et al., 2007). Il en résulterait une plus grande activation des neurones de projection et donc des neurones en aval qui modifieraient ainsi le comportement de l'animal en présence de l'odeur CS+. Suite à nos travaux et à l'observation que la corne latérale est impliquée dans le traitement des odeurs aversives (Wang et al. 2003), nous pouvons proposer une hypothèse légèrement différente: l'activité évoquée des PE1 diminuerait suite au conditionnement appétitif afin de ne pas activer la voie d'évitement à l'odeur au niveau de la corne latérale, la voie d'attraction étant médiée par un autre réseau efférent des CPs.

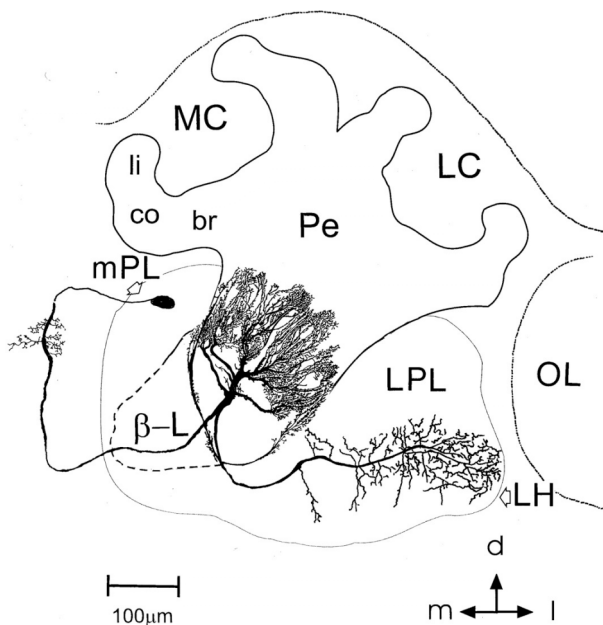


Figure 53 : Reconstruction du neurone PE1 dans le cerveau de l'abeille.

Le neurone PE1 arborise largement dans le pédoncule (Pe). Le corps cellulaire est localisé médialement et antérieurement et donne naissance à un neurite qui arborise dans le lobe protocérébral contra-latéral (mPL). Une branche de ce neurite part latéralement au niveau du lobe protocérébral latéral (LPL) et termine dans la corne latérale (LH). (Rybak and Menzel, 1998)

Nos travaux montrent que les neurones MB-V2 jouent un rôle essentiel lors du rappel des mémoires olfactives aversives. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives. Tout d'abord, il

serait intéressant d'étudier le rôle des neurones MB-V2 pendant le rappel de mémoires olfactives appétitives en bloquant la neurotransmission de ces neurones avec Shi^{ts} . On pourrait ainsi imaginer que lors du test, les neurones MB-V2 sont activés après un conditionnement aversif, renforçant ainsi l'échappement au CS+ et inhibés après un conditionnement appétitif, diminuant ainsi l'évitement de l'odeur aversive associée positivement au sucre.

Par ailleurs, nous ne savons pas si les neurones MB-V2 sont odeur-spécifique. Les résultats publiés par Tanaka et al. (2008) décrivaient 2 à 3 corps cellulaires pour les neurones MB-V2. Néanmoins, nos résultats indiquent qu'un plus grand nombre de cellules composent les neurones MB-V2. Ainsi, près de 70 corps cellulaires ont été identifiés. Le nombre de neurones MB-V2 est donc proche du nombre de récepteurs olfactifs et du nombre de glomérules présents chez la drosophile (Stocker et al., 1997; Vosshall et al., 2000). Il est donc envisageable qu'une combinaison de neurones MB-V2 réponde spécifiquement à une molécule odorante. Des expériences d'imagerie *in vivo* devraient nous permettre de répondre à un certain nombre de ces questions. L'observation directe de l'activité des neurones devrait permettre de déterminer dans un premier temps si ces neurones répondent aux odeurs. Il serait ensuite intéressant d'étudier la réponse de ces neurones aux deux odeurs CS+ et CS- après conditionnement, afin d'observer si une trace mnésique est formée dans ces neurones. Si tel est le cas, il est envisageable de bloquer les neurones des CPs et d'imager en même temps les neurones MB-V2 afin de déterminer le mécanisme de formation de cette hypothétique trace mnésique. Ces expériences devraient par ailleurs permettre de déterminer si l'activité des neurones de sortie est augmentée ou diminuée après conditionnement, indiquant un rôle activateur ou inhibiteur de ces neurones au niveau de la corne latérale.

Jusqu'à présent le rôle de la corne latérale dans la formation de la mémoire olfactive a été très peu étudié, principalement car le blocage des neurones de projection entraîne des défauts d'olfaction importants (Heimbeck et al., 2001). Néanmoins, plusieurs études ont démontré à l'aide de clones cellulaires de neurones de projection que ceux-ci projettent de manière stéréotypée sur la corne latérale en fonction de leur glomérule d'origine (Marin et al., 2002; Wong et al., 2002) et qu'un neurone intrinsèque donné de la corne latérale reçoit des afférences spécifiques de certains glomérules (Tanaka et al., 2004). Par ailleurs, les terminaisons des neurones de projection ne seraient pas regroupées en fonction de la nature chimique de l'information qu'ils transmettent mais plutôt selon leur « valeur biologique », telle que odeurs appétitive ou aversive, phéromone, odeur fruitée *etc.* (Jefferis et al., 2007).

Chez les fourmis, deux voies de réponse aux phéromones d'alarme ont été caractérisées par électrophysiologie. Dans la première, les neurones de la corne latérale servent de relais entre les structures impliquées dans la détection des phéromones d'alarme et les zones de contrôle pré-

moteur, alors que ce sont les neurones des CPs qui jouent ce rôle dans la deuxième voie (Yamagata et al., 2007). Ainsi, les auteurs proposent que le comportement naturel de réaction à une phéromone d'alarme, très stéréotypé, dépend de la voie de la corne latérale alors que le comportement d'agression, modulé par le contexte et notamment par les phéromones d'alarme, et qui dépend de l'apprentissage et de la mémoire (Yurkovic et al., 2006), serait contrôlé par les CPs. Par ailleurs chez la drosophile, le blocage des neurones de projection abolit le comportement de parade nuptiale, indépendant de l'expérience (Heimbeck et al., 2001), alors que l'ablation des corps pédonculés n'abolit que le comportement dépendant de l'expérience (McBride et al., 1999; Neckameyer, 1998). Ainsi les auteurs proposent que la voie directe des neurones de projection sur la corne latérale soit impliquée dans les mécanismes d'olfaction indépendants de l'expérience.

Toutes ces données sont en accord avec le modèle proposé (**Fig. 52**): la réponse à l'odeur conditionnée aversivement serait liée à une suractivation de la corne latérale en présence de du CS+, suite à la réactivation de la trace mnésique dans les CPs et l'activation des MB-V2 qui projettent sur la corne latérale. L'utilisation de pilotes d'expression spécifiques des neurones intrinsèques de la corne latérale avec la toxine Shi^{ts} pourrait permettre de comprendre un peu mieux le rôle de la corne latérale dans le rappel de la mémoire olfactive chez la drosophile, mais il est à craindre que des défauts d'olfactions perturbent l'analyse des phénotypes de mémoire. Ainsi, le rôle de la corne latérale pourrait être plus facilement analysé par imagerie *in vivo* après conditionnement.

Par ailleurs, afin de préciser le rôle de la corne latérale et des neurones MB-V2, il pourrait être intéressant d'activer les neurones MB-V2 par l'expression d'un transgène *ChannelRhodopsin* (Boyden et al., 2005; Nagel et al., 2005) ou par *dTrp* (Parisky et al., 2008; Shang et al., 2008) pendant un test olfactif. Des mouches naïves auraient à choisir entre de l'air ou une odeur naturellement appétitive (ou neutre). L'activation artificielle des neurones MB-V2 durant ce test pourrait changer l'attraction à l'odeur appétitive en une réaction d'évitement par la stimulation des voies naturelles d'échappement à l'odeur au niveau de la corne latérale.

Enfin, il est important de noter que les neurones MB-V2 projettent également sur le protocérébrum moyen supéro-médial et que ce neuropile pourrait jouer un rôle dans la mémoire olfactive aversive. La fonction et l'organisation de cette région est totalement inconnue à ce jour.

1.2 Rôle des neurones révélés dans les lignées MZ0604 et NP689 dans la mémoire olfactive

Le blocage de la neurotransmission des neurones marqués dans la lignée *MZ604* pendant le rappel induit un défaut de MLT et de MRA mais pas de la mémoire à 2 heures. Par ailleurs, ces neurones ne semblent être requis ni pendant l'apprentissage, ni pendant la consolidation, indiquant qu'ils joueraient un rôle spécifique dans la restitution des mémoires consolidées.

Le blocage de la neurotransmission des neurones marqués dans la lignée *NP689* pendant le rappel induit également des défauts de MRA et de MLT. Par ailleurs, le blocage de ces mêmes neurones pendant un conditionnement massé induit également un défaut de MRA à 24 heures. Il est étonnant de constater que le blocage des neurones *NP689* pendant le protocole court n'induit pas de défaut de mémoire à 2 heures alors que les protocoles massé et court permettent tous deux la formation de MRA. Ces neurones pourraient ainsi jouer un rôle spécifique lors de conditionnements intensifs. Malheureusement, il est difficile de vérifier cette hypothèse avec le protocole espacé, les mouches ayant des performances mnésiques très faibles à 24 heures lorsque le conditionnement a lieu à haute température pendant une longue durée (nos données non publiées).

La suite de ce projet devrait nous permettre de vérifier si les défauts de mémoire observés lors de ces expériences sont dus au blocage des neurones extrinsèques. En effet, tout comme *MZ0604*, la lignée *NP2755* marque également les neurones MB-MV1. Par ailleurs, deux lignées marquant les neurones MB-V3/V4 sont également disponibles. Comme *NP689*, le pilote d'expression *NP2150* marque les deux types neuronaux alors que *NP7125* marque uniquement les neurones MB-V3. Ainsi, l'étude en parallèle de ces deux lignées devrait nous permettre de confirmer ou infirmer l'identité des neurones requis pour quel type de mémoire.

Enfin, nous pourrions déterminer la polarité de ces neurones, à l'aide de marqueurs pré-synaptiques tels que UAS-syt-GFP. Les neurones MB-MV1 étant dopaminergiques, ceux-ci sont probablement afférents aux CPs.

1.3 Rôle des neurones DPM dans le rappel de la MLT

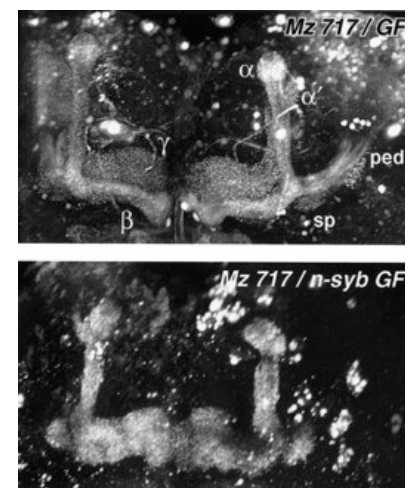
Le crible a également permis d'établir un nouveau rôle pour les neurones DPM. Des études précédentes ont permis de déterminer que le blocage de ces neurones entre 30 minutes et une heure après un cycle de conditionnement induit un défaut de mémoire à 3 heures similaire à celui observé dans le mutant *amnesiac* (Keene et al., 2006; Keene et al., 2004; Waddell et al., 2000) et qu'une

trace mnésique est détectée dans les neurones DPM trente minutes après conditionnement (Yu et al., 2005). Par ailleurs, la trace mnésique visible dans les neurones α' est dépendante de la libération de la synthèse du peptide Amn par les neurones DPM (Wang et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les neurones DPM et les neurones α'/β' forment une boucle de régulation positive requise précocement pour la formation de la mémoire olfactive aversive. Néanmoins, même si ces neurones jouent un rôle précoce, rien n'indique que ces neurones sont effectivement requis pour l'apprentissage et la formation de la MCT. En effet, l'effet du blocage de ces neurones n'a été testé qu'à des temps plus tardifs (3 heures) et ceux-ci pourraient donc jouer un rôle dans la consolidation des mémoires à 3 heures, comme la MMT et la MRA.

Pendant ma thèse, j'ai pu démontrer qu'en plus de leur rôle pendant la consolidation, la neurotransmission des DPM est requise pour la restitution de la MLT mais pas celle de la MRA. De surcroît, la trace mnésique observée dans les neurones α après un conditionnement espacé est dépendante d'*amn* (Yu et al., 2006). Ces différents résultats suggèrent donc que la trace mnésique de la MLT pourrait dépendre de la signalisation des DPM pendant la consolidation, qui activeraient la voie de l'AMPC dans les corps pédonculés par la neurosécrétion du peptide Amn ou par la libération d'acétylcholine (Keene et al., 2004). Par ailleurs, il a été suggéré que les neurones DPM sont afférents aux corps pédonculés (Ito et al., 1998) (**Fig. 54**), toutes leurs terminaisons étant localisées sur les lobes des CPs. Ainsi, les neurones DPM ne seraient pas des neurones de sortie de la MLT à proprement dit, mais seraient plutôt des neurones « réactivateurs » de la trace mnésique des lobes α pendant le rappel de la MLT aversive.

Figure 54 : Les neurones DPM sont afférents aux CPs

Projection en Z de la lignée MZ717, marquant les neurones DPM. Lorsque le rapporteur UAS-GFP est utilisé, tous les neurones DPM sont marqués (image du haut). Un marqueur similaire est obtenu au niveau des CPs avec le rapporteur UAS-n-syb-GFP alors que celui-ci ne marque que les terminaisons pré-synaptiques (Ito et al., 1998).



Néanmoins, on peut tout à fait envisager qu'il existe des synapses réciproques entre les CPs et les DPM, qui seraient impliqués lors du rappel de la MLT dans une boucle positive. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait vérifier la polarité des neurones au niveau des synapses formées entre les corps pédonculés et les DPM. Un tel projet nécessiterait probablement l'utilisation de marqueurs

pré- et post-synaptiques en microscopie électronique, une approche lourde qui n'est pas couramment utilisée au laboratoire. Une autre possibilité serait d'étudier l'activité des DPM et des lobes par imagerie calcique. Par exemple, il serait intéressant d'observer la réponse calcique des neurones DPM lorsque la neurotransmission des CPs est bloquée à l'aide de *shi^{ts}*. Si les neurones DPM sont effectivement des neurones afférents aux CPs, la réponse calcique des neurones DPM devrait rester inchangée à température restrictive. À l'inverse, on pourrait également bloquer la neurotransmission des DPM et imager l'activité dans les lobes des CPs, afin de vérifier que l'activation des DPM pendant le test est nécessaire pour réactiver la trace mnésique de la MLT dans les lobes α . Cependant, pour réaliser ces différentes expériences, il est nécessaire de construire de nouvelles lignées transgéniques afin de cibler l'expression de la sonde calcique dans un type de neurones et *Shi^{ts}* dans l'autre type.

Enfin, nous voudrions déterminer si ce sont les projections des DPM au niveau des neurones α/β ou α'/β' ou les deux qui sont nécessaires pendant le rappel de la MLT. L'expression du transgène *UAS-DSCam-17:2* dans les DPM entraîne une perte spécifique des projections sur les lobes α/β (Keene et al., 2006). Dans un premier temps nous allons étudier la MLT des mouches *C316/UAS-DSCam-17:2*. Si cette MLT est défectueuse alors que ces individus présentent une MTM normale (Keene et al., 2006) alors nous aurons réussi à dissocier les fonctions des DPM lors de la consolidation de la MTM et lors du rappel de la MLT. Au contraire, si les mouches *C316/UAS-DSCam-17:2* ont une MLT normale, cela suggérerait que les DPM agissent sur les lobes α' lors du rappel de la MLT.

2 Identification d'un nouveau mutant de mémoire résistante à l'anesthésie et dynamique des phases de mémoire.

Lorsque je suis arrivé au laboratoire, un seul mutant de MRA était connu, *radish* (*rsh*), qui présente un défaut de mémoire précoce et perdurant dans le temps après un conditionnement simple. La mémoire résiduelle dans le mutant *rsh* est sensible à une anesthésie par le froid, indiquant que c'est la MRA qui est spécifiquement affectée dans ce mutant (Folkers et al., 1993) (**Fig. 55-A**). *rsh* est également mutant après un protocole massé à 24 heures, et après un conditionnement espacé à 24 heures mais pas à 48 heures (**Fig. 55-B**) (Tully et al., 1994). La MRA ne perdurant qu'une journée après un conditionnement massé, il a donc été conclu que le défaut observé dans *rsh* après un protocole long est un défaut de MRA, et donc que cette mémoire est formée après un apprentissage espacé (Tully et al., 1994). En fait il a été montré récemment au laboratoire que *rsh* présentait une très faible mémoire à 24 heures après un conditionnement espacé, suggérant qu'il jouait également un rôle, physiologique ou développemental, dans la formation de la MLT aversive (cf. **Fig. S3**, p.90).

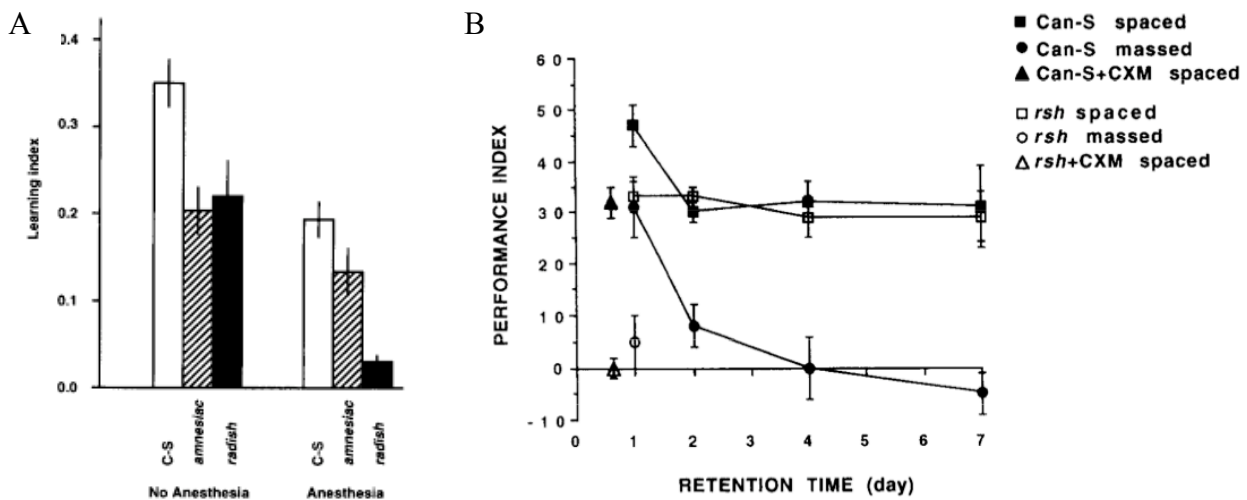


Figure 55 : *radish* est un mutant de MRA

- (A) La mémoire à 3 heures est réduite dans le mutant *rsh* après un cycle de conditionnement et est comparable à celle d'*amn*. Une anesthésie par le froid, 2 heures après conditionnement réduit significativement la mémoire à 3 heures pour *Canton-S* et *rsh* mais pas pour *amn*. La mémoire résiduelle dans *rsh* sans anesthésie est donc de la mémoire labile et *rsh* est un mutant de mémoire résistante à l'anesthésie (Folkers et al., 1993).
- (B) *rsh* présente un défaut de mémoire après un conditionnement massé (comparer ronds noir et blanc à un jour). Après 10 cycles de conditionnement espacés, la mémoire présente dans *rsh* à 24 heures est significativement différente de celle des mouches contrôles (comparer carrés noir et blanc à 1 jour) ; mais ne l'est plus à partir de 48 heures.

La chute de mémoire observée à 24 heures après un protocole long dans une majorité des mutants de MLT (Comas et al., 2004; Didelot et al., 2006; Dubnau et al., 2003; Zhao et al., 2009) ou après inhibition de la synthèse protéique (Tully et al., 1994) n'est que partielle. Ces différents résultats confirmeraient donc que seule la MRA est présente après un conditionnement espacé et n'est pas affectée par les mutants de MLT ou l'inhibition de synthèse protéique (**Fig. 56-A**). Néanmoins, des expériences réalisées au laboratoire ont conduit à une hypothèse différente. Le mutant *ala* sans lobes verticaux présente une MLT totalement abolie (Pascual and Preat, 2001). Par ailleurs, après un protocole long, la mémoire à 5 heures est significativement inférieure à celle obtenue après un cycle de conditionnement (Isabel et al., 2004). Ainsi, plus les mouches *ala* apprennent, moins bien elles se souviennent. Il en a été conclu que la MRA n'était plus présente après un conditionnement espacé, soit parce qu'elle était effacée pendant la formation de la MLT (**Fig. 56-B**), soit parce qu'elle était transformée en MLT en se combinant avec la MMT.

Peu d'éléments nouveaux ont permis de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses ces dernières années. Ainsi, il était donc important d'identifier de nouveaux gènes jouant un rôle positif

sur la formation de la MRA, afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents et les relations entre les deux mémoires consolidées, la MRA et la MLT.

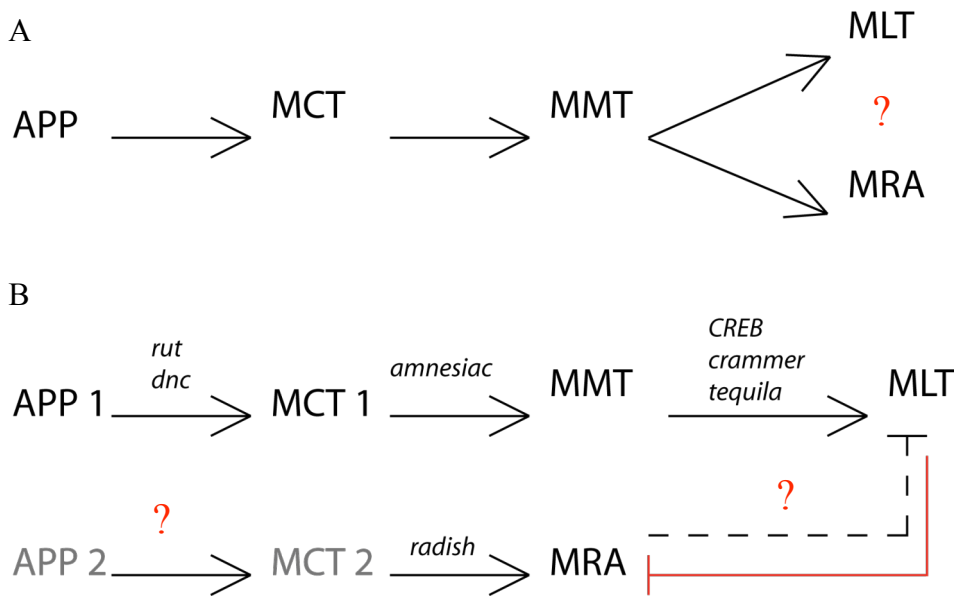


Figure 56 : Dynamique des phases de mémoire

Les phases de mémoire formées après un conditionnement aversif olfactif. A : Modèle classique. Les produits des gènes *dunce*, *rutabaga*, *amnesiac* jouent un rôle dans la formation de la MCT et de la MMT par la régulation de la voie AMPc. Deux types de mémoire consolidées existent. La MLT, dépendante de la synthèse protéique est formée après un protocole espacé et requiert les produits des gènes *CREB*, *crammer* et *tequila*. La MRA est formée après les protocoles court, massé et long et requiert le produit du gène *radish*. La MRA et la MLT coexisteraient donc après un conditionnement long. B : modèle alternatif. Deux voies d'apprentissage parallèles sont distinguées. La première dépend de la voie AMPc. La seconde permet la formation de MRA et est indépendante de l'AMPc. A long terme, la MLT efface la MRA et de manière réciproque, la MRA pourrait bloquer la formation de la MLT. Les points d'interrogation montrent les questions en suspens : est-ce-que la MRA et la MLT co-existent après un apprentissage espacé ? Est-ce-qu'il existe un apprentissage indépendant de la voie AMPc ? Est-ce-que la MRA bloque la formation de la MLT ?

2.1 Identification de *megad*, un nouveau mutant de MRA

J'ai donc continué pendant ma thèse le crible initié par Guillaume Azarias, étudiant de M2, qui avait commencé à caractériser des mutants potentiels de MRA. Ce crible de lignées *Gal4* a permis l'identification d'un nouveau mutant de mémoire, *memory-gating-defective* (*megad* ou *CG8034*). L'insertion de l'élément-P *GAL2805* dans *megad* induit un défaut de mémoire à 24 heures après un protocole massé (**Fig. 26**) mais pas après un protocole long (**Fig. 22**). L'utilisation d'un ARNi avec le système Gene-Switch (Mao et al., 2004) a permis d'étudier le rôle physiologique de *megad* tout en s'affranchissant d'éventuels problèmes de développement (**Fig. 1**, p. 81-82). Ainsi, comme avec le mutant *megad^{gal2805}*, l'inhibition du gène dans les corps pédonculés chez l'adulte induit un défaut après un conditionnement massé à 24 heures mais pas après un conditionnement espacé. Ces résultats indiquent que le gène *megad* joue un rôle physiologique spécifique dans la formation de la MRA. Par ailleurs, la mémoire résiduelle à 24 heures de mutants de MLT est bien de la MLT puisqu'elle est sensible à un inhibiteur de synthèse protéique (**Fig. 3**, 83-84). Ces différents résultats confirment donc l'hypothèse suggérée auparavant que la MRA n'est pas présente à 24 heures après un conditionnement espacé. Pourquoi la MRA disparaît-elle lors du conditionnement espacé ? Celle-ci pourrait être transformée en MLT en combinaison avec la MTM. Dans ce cas le mutant *megad* devrait présenter une mémoire défectueuse à 24 heures après un protocole long puisque la MLT devrait être affectée, ce qui n'est pas le cas. Un cas de figure permettrait de rester dans le cadre de cette hypothèse: si *megad* avait une MRA diminuée en raison d'une tendance de la MRA du mutant à se transformer plus facilement en MLT même en absence de conditionnement espacé. Ce cas de figure est toutefois peu probable puisque que *megad* présente un défaut initial de la voie II qui donne naissance à la MRA. En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que la MRA est abolie après un conditionnement espacé (**Fig. 57**).

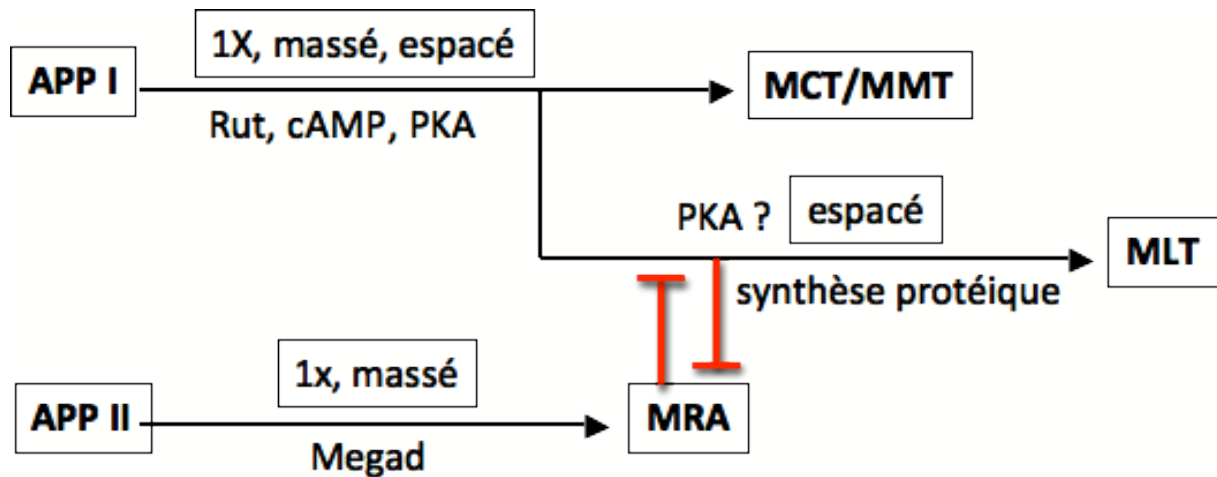


Figure 57 : Dynamique des phases de mémoire chez *Drosophila melanogaster*.

Deux voies d'apprentissage parallèles existeraient chez la drosophile. La première (APP I) est initiée par les protocoles court, massé et espacé. Elle est dépendante de la voie AMPc et de la PKA et permet la formation de deux mémoires labiles, la mémoire à court terme et la mémoire à moyen terme. Après un conditionnement espacé, elle permet de générer la mémoire à long terme, dépendante de la synthèse protéique. La seconde voie d'apprentissage est initiée par les protocoles court et massé. Elle ne dépend pas de l'AMPc mais dépend de Megad et permet la formation de la MRA. Les MRA et MLT sont exclusives : la MRA est un verrou pour la formation de la MLT et la formation de MLT efface la MRA. La PKA pourrait jouer un rôle primordial dans ce mécanisme de transition entre les deux mémoire consolidées, en favorisant la formation de MLT et en inhibant la formation de MRA. La MLT ne serait pas issue de la transformation des MCT /MMT mais sa formation serait initiée en parallèle de la formation des MCT/MMT (Izquierdo et al., 1998).

Dans ce cas pourquoi existe-il deux formes de mémoires consolidées chez la drosophile et pourquoi sont-elles mutuellement exclusives ? Il a été proposé que la MRA pourrait jouer un rôle de verrou pour la formation de MLT (Isabel et al., 2004). Après un apprentissage espacé, la MRA est effacée et ne bloque plus la formation de la MLT. Ce mécanisme permettrait de conserver les informations qui ont été accumulées lors de plusieurs expériences indépendantes et qui ont donc une forte valeur prédictive par la formation de la MLT. Au contraire, les expériences qui n'ont été rencontrées qu'une seule fois (protocole court) ou plus longtemps (protocole massé) généreraient une mémoire semi-consolidée, la MRA, qui ne requiert pas une coûteuse cascade d'activation de gènes pour sa formation (Mery and Kawecki, 2005). Ainsi, si la MRA est affaiblie, la formation de MLT devrait être facilitée. Effectivement, dans le mutant de MRA *megad*, la formation de la MLT est facilitée puisque trois cycles de conditionnement espacés sont suffisants pour induire la formation de cette mémoire contrairement aux mouches sauvages (Fig. 4, p. 86-87) (Fig. 57). La MRA joue donc bien un rôle de verrou pour la formation de la MLT.

La prédiction réciproque de ce résultat est qu'une augmentation de MRA (ou son renforcement) devrait inhiber ou bloquer la formation de MLT. Deux conditions semblent conduire à une MRA augmentée: 1) la surexpression de l'aPKM, une isoforme tronquée et constitutivement active de la PKC entraîne une augmentation de mémoire à 3 heures après un cycle

de conditionnement et à 24 heures après un protocole massé (Drier et al., 2002); 2) une diminution de 40% de l'activité catalytique de la PKA (mutant *DCO*) conduit à une MRA augmentée après un conditionnement simple ou massé. Les performances après un conditionnement espacé chez ces mutants sont normales pour le mutant surexprimant la PKM (Drier et al., 2002), et chez le mutant perte de fonction de la PKA à 4 jours (Horiuchi et al., 2008). Ces auteurs ont conclu que la MLT était normale chez ces mutants. Néanmoins, rien ne prouve dans ces expériences que la mémoire formée après conditionnement espacé soit réellement de la MLT. On peut ainsi tout à fait envisager que l'augmentation de MRA empêche effectivement la formation de MLT et que la mémoire mesurée à 4 jours après un protocole massé soit une forme de MRA plus importante et mieux consolidée. Une analyse qualitative de la mémoire formée chez ces mutants après conditionnement espacé devra être réalisée en présence d'un marqueur de la MLT tel qu'une sensibilité à la CXM, pour savoir si une augmentation de la MRA s'accompagne d'une diminution de la MLT.

La surexpression du gène *megad* dans les CPs de mouches adultes n'induit ni augmentation ni diminution de MRA (**Fig. 32**). Il reste néanmoins à vérifier par Western Blot ou par PCR quantitative que la protéine ou le transcrite codés par *megad* sont effectivement plus abondants dans la combinaison génétique utilisée. Par ailleurs, il est envisageable que la MRA atteigne déjà son niveau maximal dans des mouches sauvages et que la surexpression de *megad* ne puisse augmenter quantitativement cette mémoire. Il est cependant envisageable que la MRA soit plus facilement formée lors de cette surexpression ou mieux consolidée. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si la surexpression de *megad* facilite la formation de MRA à 24 heures après un cycle de conditionnement ou si la mémoire formée après un protocole massé est plus stable dans le temps. Enfin, d'un point de vue qualitatif, il est possible que le blocage exercé par la MRA sur la formation de la MLT soit encore plus important lors de la surexpression de *megad*, empêchant la formation de MLT après 5 cycles de conditionnement espacé. Des expériences seront réalisées pour tester ces hypothèses.

Une questions en suspens dans le modèle que nous proposons est de savoir s'il existe une deuxième voie d'apprentissage, indépendante de l'AMPc. En effet, même dans le mutant nul *rut*, un apprentissage a encore lieu (Livingstone et al., 1984; Zars et al., 2000). Par ailleurs, l'expression de la toxine pertussis, bloquant l'activation des récepteurs couplés aux protéines G induit un défaut d'apprentissage indépendant de *rut* (Ferris et al., 2006). Enfin, il a été montré au laboratoire que la MRA est normale dans le mutant *rut*, suggérant que la formation de cette mémoire serait indépendante de l'AMPc (Isabel et al., 2004). Dans le mutant *megad*, la mémoire mesurée immédiatement après le conditionnement est également diminuée (**Fig. 1-C**, p. 81-82). La MRA n'étant pas formée à un temps aussi précoce, ce résultat suggère que *megad* n'est pas à proprement

parlé un mutant de MRA mais un mutant d'apprentissage de la voie de formation de la MRA. Néanmoins, aucune expérience ne permet pour l'instant de conclure que la voie d'apprentissage dans laquelle *megad* est impliquée est réellement indépendante de la voie de l'AMPC. Ainsi, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en testant les capacités d'apprentissage d'un double mutant *rut,megad*. Par ailleurs, si la voie d'apprentissage de *megad* est réellement indépendante de l'AMPC, il serait également intéressant de bloquer les récepteurs couplés aux protéines G par l'expression de la toxine pertussis afin de déterminer si la voie d'apprentissage de la MRA est dépendante de l'activité de ces protéines.

2.2 Dynamique des phases de mémoire chez d'autres espèces

Les mécanismes impliqués dans la formation, la consolidation et le rappel de la mémoire sont étonnamment bien conservés chez l'ensemble des espèces (Dubnau, 2003). Généralement, un cycle de conditionnement induit la formation d'une mémoire à court terme sensible à l'anesthésie. Celle-ci dépend souvent de la voie de l'AMPC et de la PKA. Plusieurs apprentissages espacés dans le temps induisent la formation d'une mémoire à long terme, consolidée et dépendante de la transcription et de la synthèse protéique (Bailey et al., 1996; Menzel, 2001; Tully et al., 1994). Dans de rares cas, la MLT peut être formée après un cycle unique de conditionnement : c'est le cas notamment lors du conditionnement aversif chez le rat (Igaz et al., 2002), de l'apprentissage par oviposition chez les guêpes parasitoïdes (Collatz et al., 2006) et de l'apprentissage olfactif appétitif chez la drosophile (Colomb et al., 2009; Krashes and Waddell, 2008). Existe-t-il une mémoire homologue à la MRA, semi-consolidée et indépendante de la synthèse protéique chez d'autres espèces que la drosophile ?

Plusieurs études suggèrent l'existence de formes de mémoires similaires à la MRA chez d'autres espèces. Chez le crabe *Chasmagnathus granulatus*, la présentation d'un stimulus visuel au-dessus de l'animal est considéré comme un danger potentiel et induit une réaction de fuite. La présentation répétée de ces stimuli entraîne une habituation, le crabe réagissant moins après quelques essais. Lorsque les stimuli visuels sont présentés successivement et sans intervalle de repos (ITI), un comportement d'habituation est induit lors des premières présentations mais disparaît assez rapidement, aucune différence n'étant détectée à 24 heures entre des animaux entraînés et des animaux contrôles. Au contraire, lorsque les stimuli sont présentés sur la même durée mais moins fréquemment (espacé), une habituation est encore visible 24 heures après la fin de l'apprentissage

(Tomsic et al., 2009). Il serait intéressant de déterminer si ces habitudes peuvent être effacées après une anesthésie ou par l'inhibition de la synthèse protéique ?

Les relations entre les différentes phases de mémoire olfactives appétitives ont également été étudiées de manière intensive chez un autre insecte, l'abeille. Chez celle-ci, la présentation d'une solution sucre provoque un réflexe d'extension du proboscis (PER). L'association d'une odeur avec la solution sucrée constitue un conditionnement pavlovien très efficace (Menzel, 2001). Après cet apprentissage, une réponse de type PER a lieu lors de la présentation de l'odeur même en absence du sucre. A l'aide de ce protocole, il a été montré qu'un cycle de conditionnement induit la formation d'une mémoire durant entre un et trois jours, alors qu'un apprentissage multiple espacé induit une mémoire durant toute la vie de l'individu (Erber, 1980; Fiala et al., 1999; Hammer and Menzel, 1995; Menzel and Sugawa, 1986). Deux types de mémoire à long terme ont été décrits. La MLT précoce dure de 1 à 2 jours et dépend de la synthèse protéique (Wittstock et al., 1993; Wustenberg et al., 1998), alors que la MLT tardive dure 3 jours ou plus et dépend de la transcription (Fiala et al., 1999; Grunbaum and Muller, 1998) (**Fig. 58**). La formation de ces deux types de MLT dépend de la PKA.

L'utilisation d'agents anesthésiques tels qu'un choc par le froid ou des chocs électriques immédiatement après un cycle unique de conditionnement entraîne des défauts de mémoire de 30 minutes à 3 heures après le conditionnement. Si ces agents anesthésiques sont appliqués plus tardivement, aucun effet n'est visible sur les performances mnésiques des abeilles, la mémoire s'étant consolidée (Fiala et al., 1999; Muller, 1996). Deux mémoires sont formées après un cycle de conditionnement: une mémoire sensible à l'anesthésie durant quelques heures et une mémoire résistante à l'anesthésie, qui ne dépend pas de synthèse protéique *de novo* et perdure pendant plus de 24 heures. Des apprentissages multiples facilitent la formation de cette mémoire résistante à l'anesthésie, l'application d'agents anesthésiques immédiatement après trois cycles de conditionnement n'ayant pas d'effet sur la mémoire à 3 heures (Menzel and Sugawa, 1986; Muller, 1996) suggérant qu'il n'y aurait plus de mémoire labile. Les mémoires à moyen terme formées après un cycle unique ou plusieurs cycles de conditionnement reposent néanmoins sur des mécanismes moléculaires différents (**Fig. 58**). Ainsi, la PKC semble jouer un rôle important dans la formation de la MTM après plusieurs cycles de conditionnement mais pas après un cycle unique (Grunbaum and Muller, 1998). La protéolyse de la PKC par la calpaïne permet la formation de la PKM, constitutivement active. Ainsi, l'inhibition des protéases par injection d'agents pharmacologiques réduit la formation de la PKM et également de la MTM. De manière intéressante, les deux types de MLT ne dépendent pas de la PKC, suggérant que deux formes de

mémoires résistantes à l'anesthésie sont formées en parallèle chez l'abeille comme chez la drosophile (Grunbaum and Muller, 1998; Menzel, 2001). La MTM appétitive de l'abeille présenterait donc des similarités biochimiques avec la MRA aversive de la drosophile (nous n'avons volontairement pas pris en compte les différentes structures impliquées dans la dynamique des phases de mémoire chez l'abeille car cela nous aurait entraîné loin de notre propos). L'étude biochimique de la voie orthologue à celle de Megad pourrait aider à préciser les analogies entre les phases de mémoire chez la drosophile et chez l'abeille.

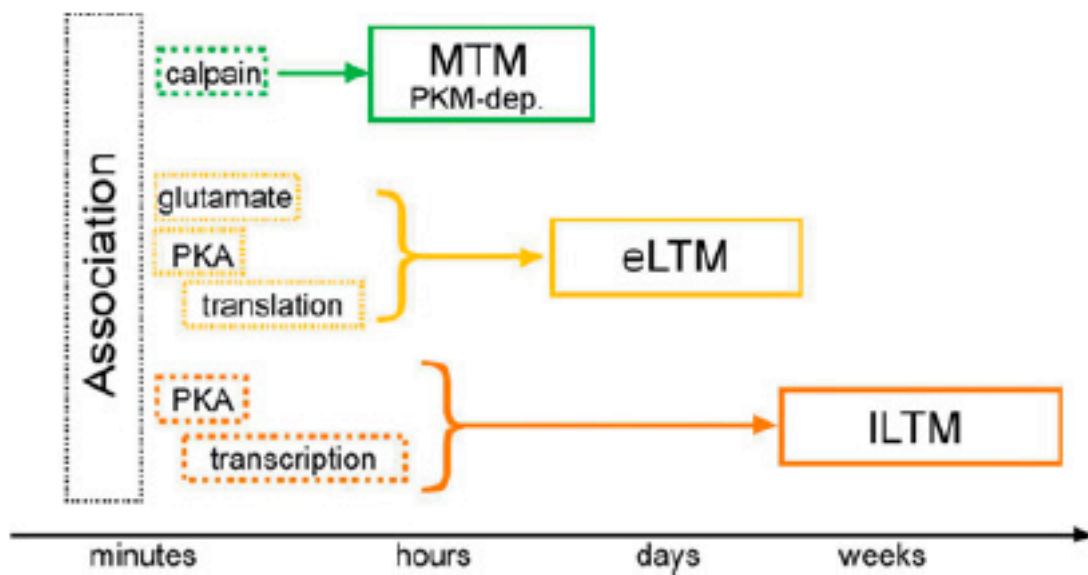


Figure 58 : Dynamique des phases de mémoire appétitive chez l'abeille après plusieurs cycles de conditionnement

La formation de la mémoire à moyen terme (MTM) requiert la protéine kinase M, issue du clivage de la PKC par la protéase calpain. La MTM est formée indépendamment et parallèlement aux mémoires à long terme. La MLT se décompose en MLT précoce (eLTM), dépendante de la traduction, et de MLT tardive (ILTM), dépendante de la transcription. La formation de la MLT requiert l'activation de la PKA dans certains glomérules des lobes antennaires. La transmission des neurones glutamatergiques joue également un rôle positif sur la formation de la MLT. Le fait que la MLT tardive puisse être formée en l'absence de MLT précoce a démontré que ces deux mémoires sont également formées en parallèle (Schwarzel and Muller, 2006).

Une autre étude a permis de caractériser les relations entre les différentes formes de mémoires consolidées chez les insectes, notamment d'un point de vue éthologique, chez les guêpes parasitoïdes *Cotesia glomerata* et *Cotesia rubecula*. En effet, ces deux espèces sont capables d'associer des odeurs de plante à la présence d'individus hôtes. Leur préférence naturelle pour certaines espèces de plantes sur lesquelles leur hôte favori est présent plus abondamment peut être modifiée par des expériences d'oviposition sur d'autres plantes (Olson et al., 2003). Chez *C. glomerata*, une MLT protéine-dépendante est formée après une unique expérience d'oviposition,

alors que trois cycles de conditionnement espacé sont nécessaires pour *C. rubecula*. Par ailleurs, la dynamique de formation de ces deux types de mémoire est différente, le processus de consolidation étant terminé 4 heures après conditionnement chez *C. glomerata* alors qu'il dure 2-3 jours chez *C. rubecula*. Par ailleurs, une mémoire homologue à la MRA, indépendante de la synthèse protéique, est présente chez *C. rubecula* 48 heures après un apprentissage espacé alors que toute la mémoire est abolie chez *C. glomerata* par l'inhibition de synthèse protéique (Smid et al., 2007). Ainsi la formation de MLT est facilitée chez *C. glomerata* (un seul cycle de conditionnement nécessaire, consolidation rapide) qui est l'espèce qui ne forme pas de MRA (ou qui est capable de l'effacer totalement). Au contraire chez *C. rubecula* la présence de MRA s'accompagne d'une MLT plus difficile à former (il reste toutefois à vérifier que la mémoire présente après inhibition de la synthèse protéique chez *C. rubecula* n'est pas *qualitativement* de la MLT comme c'est le cas chez la drosophile) (Smid et al., communication personnelle).

Le comportement naturel d'oviposition est très différent entre les deux espèces. L'espèce *C. glomerata* parasite principalement les chenilles de *Peris brassicae* mais elle est capable de parasiter également *Peris rapae*, alors que *C. rubecula* ne parasite que *P. rapae*. *P. brassicae* est une espèce grégaire ; lorsque *C. glomerata* trouve une chenille de *P. brassicae*, il est probable que de nombreuses chenilles hôtes soient présentes sur la même plante. Ainsi, l'expérience d'oviposition de *C. glomerata* sur *P. brassicae* correspond à un apprentissage unique mais hautement informatif: il se forme donc de la MLT en une seule expérience. Au contraire, *P. rapae* est une espèce solitaire. Lorsque *C. glomerata* est forcée à parasiter *P. rapae* il se forme d'abord de la MRA, qui, d'après notre interprétation, empêcherait de former de la MLT après une expérience unique ayant une faible valeur prédictive. Il faut plusieurs expériences espacées similaires pour former de la MLT. *C. glomerata* se comporte sur *P. rapae* comme le parasitoïde habituel *C. rubecula*. Ainsi la formation de la MRA (et donc la facilité à former de la MLT) dépend non pas de l'espèce de parasitoïde mais de la distribution de la chenille hôte et sa distribution.

Ainsi, plusieurs études ont montré l'existence et des dynamiques de formation différentes de plusieurs types de mémoires consolidées chez un même organisme. La mémoire formée après plusieurs cycles de conditionnement espacés induit la formation d'une mémoire durant plus longtemps mais la synthèse protéique requise pour sa consolidation est coûteuse pour l'organisme (Mery and Kawecki, 2005). Ainsi il peut s'avérer plus avantageux pour un organisme de former une mémoire telle que la MRA moins stable dans le temps mais moins coûteuse énergétiquement. Par ailleurs, la présence ou non de MLT chez un organisme ne serait pas due à une limitation des performances du cerveau mais plutôt à l'expression de facteurs inhibiteurs de sa formation (Abel et

al., 1998). Ainsi, la formation de MLT peut être facilitée par la surexpression de gènes clés présents constitutivement tels que le récepteur NMDA chez la souris (Tang et al., 1999) ou le gène *Notch* chez la drosophile (Ge et al., 2004) ; par leur inhibition comme celle de la calcineurine (Malleret et al., 2001) ou de la protéine phosphatase 1 chez la souris (Genoux et al., 2002) ; ou encore par la sélection de facteurs multigéniques appropriés (Mery and Kawecki, 2002). La drosophile est particulièrement intéressante pour étudier ce genre de mécanismes, car il est facile de contrôler l'expression de gènes avec des systèmes inductibles. Néanmoins, la comparaison avec d'autres organismes s'avère très enrichissante. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de la PKM ou de Megad sur la formation de la MLT chez l'abeille ou chez *C. glomerata* et *C. rubecula*.

Au sein d'un même organisme, la dynamique des phases de mémoire peut être différente en fonction du type d'apprentissage. Ainsi, chez *D. melanogaster*, une mémoire dépendante de la synthèse protéique est formée après un cycle unique de conditionnement olfactif appétitif alors qu'un protocole espacé est requis pour la formation de MLT lors d'un conditionnement aversif (Colomb et al., 2009; Krashes and Waddell, 2008). L'existence de la MRA après un conditionnement appétitif reste encore à déterminer à ce jour, le mutant *rsh* présentant des défauts de motivation au sucre (Colomb et al., 2009). Néanmoins, la formation de MLT après un cycle unique de conditionnement laisse présager que le blocage exercé par la MRA sur la formation de MLT aversive serait moins efficace lors d'un conditionnement appétitif. L'étude du mutant *megad* pourrait permettre dans un premier temps de déterminer si la MRA est formée dans le cadre d'un protocole appétitif, puis de comprendre comment le blocage de formation de MLT est levé dans ce type d'apprentissage.

Si plusieurs études ont permis de caractériser des dynamiques différentes pour les mémoires formées après des conditionnements espacés ou massés, peu de données sont disponibles sur les mécanismes moléculaires spécifiques à la formation de la MRA ou de son équivalent chez d'autres espèces. Ces mécanismes pourraient résider dans des cinétiques ou des localisations subcellulaires différentes d'une même protéine, comme chez l'aplysie, ou la dynamique de translocation de la PKA varie après un conditionnement massé ou espacé (Farah et al., 2009) ; ou bien sur des spécificités moléculaires propres à chaque type de mémoire, comme c'est le cas pour le gène *megad*, celui-ci étant requis spécifiquement pour la formation de la MRA.

2.3 Rôle putatif de *megad* dans la formation de la MRA

Le gène *megad* code une protéine de 647 acides aminés. Par homologie de séquence avec d'autres protéines, les régions N- et C-terminale sont reconnues comme des domaines MFS (Major Facilitator Superfamily). Les protéines à domaine MFS permettent une facilitation du transport à travers la membrane plasmique de substances hydrophiliques telles que des ions, des sucres, des substances médicamenteuses, des neurotransmetteurs, des acides aminés ou des peptides. Les protéines à domaine MFS font généralement de 400 à 600 acides aminés et la plupart contiennent 12 domaines transmembranaires en hélice alpha. L'étude de la séquence protéique de Megad révèle la présence de 12 domaines transmembranaires, aux extrémités N- et C-terminale (**Fig. 59-A et B**). Par ailleurs, ces deux régions présentent une forte homologie avec de nombreux transporteurs aux acides monocarboxyliques (MCT) et le gène *megad* est indiqué dans plusieurs sites de classification des protéines comme étant un membre potentiel des 18 candidats de cette famille. Ainsi, le gène *megad* coderait pour un membre de la famille des protéines à domaine MFS, un transporteur aux acides monocarboxyliques.

A

```

1  MASKQPRKVPDGGGWVACFGVSLVNLATRSIEPSFGLLFGDTLKELNV
51  GTTGAAVIISALDVCMMNFSGLFVGPLLKEFSYRKVAIAGSLCGLGLALT
101 SPATSMAHILSTYSVINGIGVGLSTSAAFVALNHYFKHCRGQAVGLSMAG
151 TAMGMLIMPQLVRILLEAYDFRGAVLLLAGVALNATVGSVLLQPVKWHMK
201 EEFDDEELMCISALPTQPQLTVGGAGGAASAGAPVFKVIKEDGNEDAL
251 PEMNTLLFHKPHPHQHSRKNYSEMAMNTMNGSRLGIPKRPTFPRIMSLA
301 GVQSAAHGAGGDSGGYTSQAEVNATQLRCRKASVTSNLSYMDFTGSILQV
351 HLNTGDDEFEQNDRELRRVGTATGSIVLGGHRDSFIKMKPTELDKQAEAA
401 AALDEEAKKAKKPGFWRRFADLLDIDMLKDKMFLNLLFGLSIFYVAEMN
451 FKMVTPFFANLGYQKTDVAFCLSITAITDIAARIVLPPIFDRTTIKKRT
501 IFLVSIIFVALTRSIMAEQTEWTQLMIWLSICGFFRGSALSNTLTVSEY
551 CSLEKLPSAFGWHLVGKALFVITFGPLIGLIRDVTDSPICHTQSVICIM
601 ICATAWGIEYLVEYIQSRRRTADAAQLPTQDVGATTTATSDQNQDVKL

```

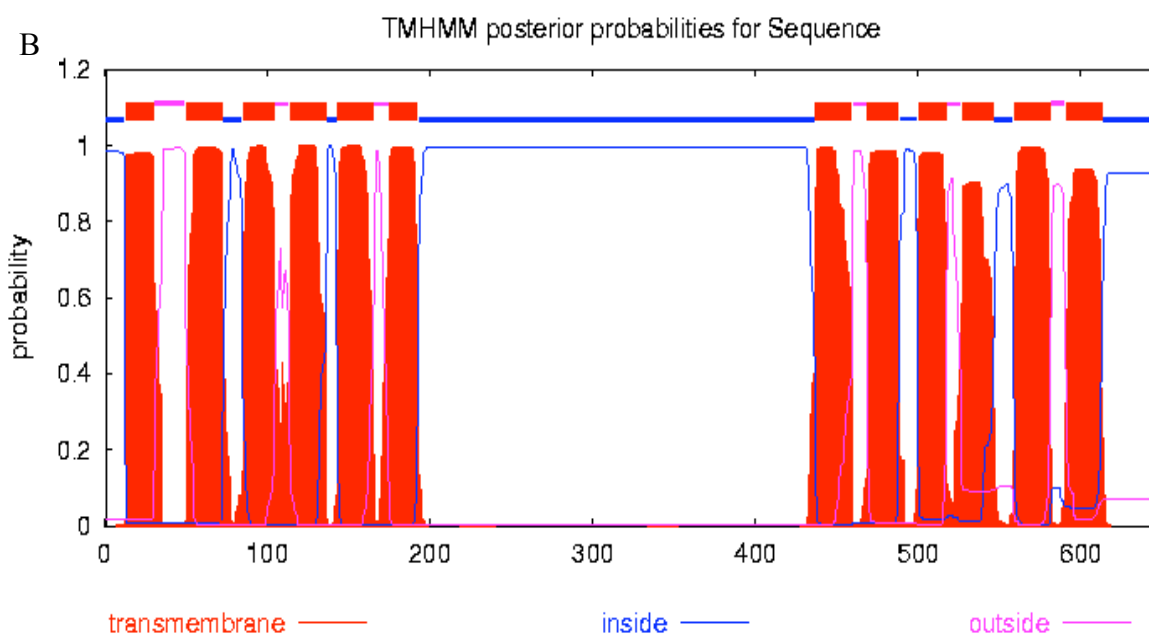


Figure 59 : Etude de la structure protéique de Megad.

A : Séquence protéique codée par le gène *CG8034*. Les domaines MFS (surlignés en vert) ont été déterminés. En rouge sont surlignés les séquences reconnues comme des domaines transmembranaires par le programme BLAST de NCBI. Les douze domaines transmembranaires (surlignés en vert) ont été déterminés à l'aide du programme TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>).

B : Prédiction des domaines transmembranaires. Les régions transmembranaires putatives sont indiquées en rouge, les domaines externes en rose et les domaines internes en bleu.

Seuls deux MCT ont été caractérisés sur les 18 membres potentiels de la famille. Les gènes *outsiders* (Yamada et al., 2008) et *silnoon* (Jang et al., 2008) sont tous deux impliqués dans le processus de mort cellulaire. Cependant, le rôle de ces MCT a été un peu mieux caractérisé chez les rongeurs. Chez la souris, par homologie de séquence, 14 membres putatifs ont été identifiés dans la famille des MCT (également appelée SLC16) (Halestrap and Meredith, 2004). La comparaison de la séquence protéique de Megad avec les différents MCT de *Mus musculus* révèle une forte similarité. La partie N-terminale (200 premiers acides aminés de Megad) est celle qui paraît la mieux conservée, avec près de 50% de similarité avec la séquence N-terminale de certains MCT (**Fig. 60**). Par ailleurs, une séquence peptidique de 8 acides aminés est quasi systématiquement conservée dans les différentes protéines MCT, aussi bien chez la drosophile que chez la souris (cadre rouge, **Fig. 60**). Cette séquence n'est pas reconnue comme un motif spécifique mais son importante conservation dans les différents MCT suggère qu'elle pourrait jouer un rôle clé. La partie C-terminale (200 derniers acides aminés) est moins bien conservée, ne présentant qu'une faible homologie avec deux MCT (6 et 14). La boucle intra-cellulaire de Megad (acides aminés 200 à 450) quant à elle, ne présente aucune homologie de séquence avec les MCT. Quel est le rôle physiologique de ces transporteurs dans le cerveau murin?

```

Score = 89.7 bits (221), Expect = 7e-18, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 55/194 (28%), Positives = 98/194 (50%), Gaps = 8/194 (4%)

Query 6 PRKVA PDGGWGWVACFGVSLVNLATRSIEPSFGLLFGDTLTKELNVGTTGAAVIISALDVC 65
      P+ + PDGGWGWV S +++ P +F ++E+ T+ IS++ +
Sbjct 10 PQPLP PDGGWGWV VVCA-SFISIGFSYAFPKA VTVFFFKDIQEIFNTTSSQIAWISSIMLA 68

Query 66 MNFSGLVFGP----LLKEFSYRKVaiagsllcglglaltSPATSMAHILSTYSVINGIGV 121
      + ++G GP L+ + R V I G LLC +G+ L S + S+ + T I G+G+
Sbjct 69 VMYAG---GPISSVLVNNYGSRPVVIVGGLCCIGMILASYSNSVIELYLTVGFIGGLGL 125

Query 122 GLSTSAAFVALNHYFKHKRGQAVGLSMAGTAMGMLIMPQLVRILLEAYDFRgavlllagv 181
      + A + YF +R A G +MAG+ + + + + L Y ++G+ L+L G+
Sbjct 126 AFNLQPALTIIGKYFYRRRPLANGCAMAGSPVFLSTLAPFNQYLFNNYGWKG SFLILGGI 185

Query 182 alnatvgSVLLQPV 195
      L++ V L++PV
Sbjct 186 FLHSCVAGCLMRPV 199

```

Figure 60 : La région N-terminale de Megad possède une homologie avec les MCT murins.

Alignement de la partie N-terminale de Megad avec la partie N-terminale de la protéine MCT 2 (solute carrier family 16, member 7). Les deux protéines montrent 28% d'identité et 50% de similarité. La séquence conservée dans les différents MCT est encadrée en rouge.

La majorité de ces transporteurs est impliquée dans le transport d'acides monocarboxyliques tels que le lactate, le pyruvate ou les corps cétoniques, ces molécules étant très hydrophiles et ne pouvant pas franchir la barrière cellulaire (Pierre and Pellerin, 2005). Le transporteur MCT 8 s'est avéré être un récepteur à l'hormone thyroïdienne (Friesema et al., 2003). La mutation du gène homologue chez l'homme est responsable de retards mentaux liés au chromosome X (Brockmann et al., 2005). Un autre membre (TAT1) serait impliqué dans le transport d'acides aminés (Halestrap and Meredith, 2004). Pendant longtemps, les acides carboxyliques, et notamment l'acide lactique (lactate) étaient perçus comme des déchets, voire comme des composés toxiques et indicateurs d'une dégénérescence tissulaire. Néanmoins, plusieurs travaux récents indiquent que les carboxylates jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique, et ce notamment dans le cerveau.

Sur les 14 membres identifiés chez les rongeurs, seuls les quatre premiers MCT (MCT 1-4) semblent être exprimés dans le cerveau (Pellerin et al., 2005). Ces quatre MCT sont les plus largement étudiés et permettent de comprendre un peu mieux le rôle putatif de *megad* chez la drosophile. Les MCT 1 et 4 semblent exprimés majoritairement dans des cellules gliales, les astrocytes, et peut-être faiblement dans les neurones. Le MCT 3 est localisé dans l'épithélium de la rétine. Le seul MCT exprimé majoritairement (voire exclusivement) dans les neurones est MCT 2. MCT 2 est présent dans de nombreuses projections neuronales, aussi bien au niveau pré- que post-synaptique, suggérant que le transport de lactate permet d'alimenter l'axone en substrat énergétique afin de maintenir une activité électrique (Brown et al., 2003). En réponse à une augmentation de l'activité neuronale, les astrocytes augmentent la libération de lactate dans l'espace extra-cellulaire (Akaoka et al., 2001; Magistretti et al., 1993), probablement via les MCT 1 et 4. Le lactate serait ensuite recapté au niveau des dendrites et des axones via MCT 2 (Bergersen et al., 2001; Pierre et al., 2003; Vannucci and Simpson, 2003). Il pourrait ainsi servir de substrat additionnel pour les neurones et contribuerait énergétiquement à la maintenance de potentiels d'action (Brown et al., 2003; Schurr et al., 1988; Takata et al., 2001).

Fait intéressant, le seul MCT exprimé dans les neurones, MCT 2, est également celui qui possède la plus grande similarité de séquence avec la protéine Megad (après MCT 12). MCT 2 est exprimé principalement dans le cortex, l'hippocampe et le cérébellum et est considéré comme l'un des transporteurs majeurs du cerveau chez le rongeur. Par ailleurs, MCT 2 co-localise avec le récepteur post-synaptique $\delta 2$ au glutamate, notamment dans l'hippocampe (Bergersen et al., 2001); et pourrait interagir avec la sous-unité (GluR)2/3 du récepteur AMPA (Bergersen et al., 2001) (**Fig. 61**). Il est également exprimé dans des structures vésiculaires au niveau post-synaptique. La quantité de MCT 2 dans des neurones en culture est corrélée positivement avec la synaptogenèse,

suggérant que l'expression de MCT 2 est régulée par des facteurs en relation avec l'activité synaptique. Notamment, l'expression de MCT 2 augmente après injection de noradrénaline dans des neurones en culture (Debernardi et al., 2003).

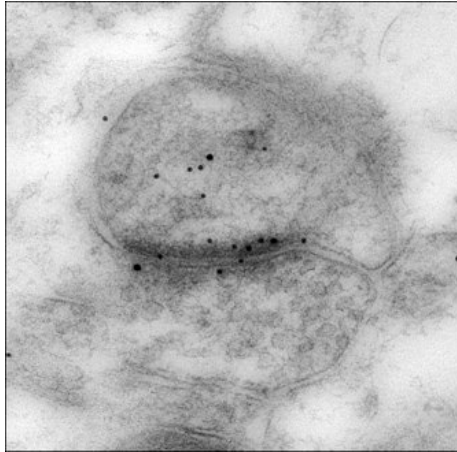


Figure 61 : Colocalisation de MCT avec les sous-unités GluR2/3 du récepteur AMPA au niveau synaptique dans le cérébelle murin.

Les protéines MCT sont marquées par des particules d'or de 10nm (petits points noirs) et les sous-unités GluR2/3 par des particules d'. Il est à noter que les deux protéines semblent également colocalisées au niveau pré-synaptique. (Pellerin et al., 2005)

Peu de données sont disponibles sur le rôle du glutamate chez la drosophile adulte. Néanmoins, seul le cœur des lobes α/β des corps pédonculés est glutamatergique (Strausfeld et al., 2003). Le profil d'expression de l'enhancer-trap *Gal2805*, inséré dans les régions régulatrices de *megad*, révèle que le GAL4 est exprimé principalement dans la partie superficielle des lobes α/β des corps pédonculés (tout sauf le cœur) (**Fig. 62**). Ainsi, il se pourrait que *megad* soit exprimé dans des neurones adjacents à des neurones glutamatergiques.

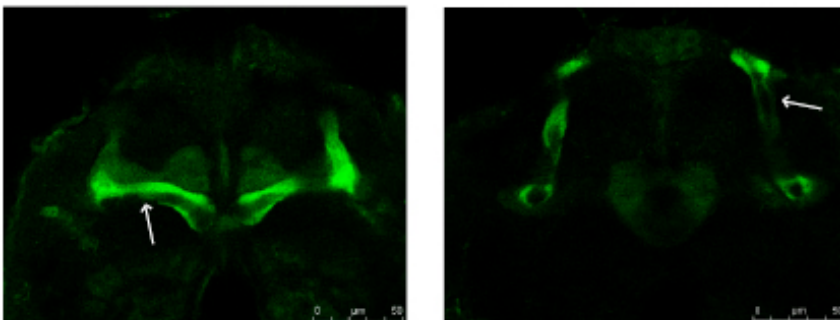


Figure 62 : Profil d'expression du pilote d'expression GAL2805.

La lignée *GAL2805* est croisée avec *UAS-CD8-GFP* et l'expression de la GFP est détectée par microscopie confocale. Le pilote d'expression ne marque pas le cœur des lobes α/β (flèches blanches), ni au niveau des lobes des lobes médians, ni au niveau des lobes verticaux.

Cependant, il est possible que *Gal2805* ne reflète pas exactement le profil d'expression de *megad*. La première étape serait donc de confirmer l'expression de *megad*, soit par hybridation *in situ*, soit par immunohistologie. Si ces résultats d'expression étaient confirmés, nous pourrions envisager que le transporteur Megad joue un rôle dans l'approvisionnement énergétique des neurones périphériques des lobes α/β et permette éventuellement un maintien de l'activité de ces neurones en réponse au glutamate. Il serait intéressant d'inhiber l'expression de récepteurs au

glutamate dans les corps pédonculés adultes, afin de déterminer si ce neurotransmetteur joue un rôle dans la formation de la MRA.

2.4 Perspectives

La découverte du mutant *megad* ouvre de nombreuses voies pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de formation de la mémoire olfactive aversive, et notamment de la MRA. Outre l'étude d'interactions putatives avec le système glutamatatergique, plusieurs pistes peuvent être explorées :

- La région chromosomique de *megad* contient plusieurs gènes codant des MCT putatifs, probablement orthologues de *megad* (**Fig. 63**). Des ARNi contre les gènes *CG8051* et *CG8028* sont disponibles dans plusieurs banques. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si ces MCT putatifs joueraient également un rôle dans la mémoire aversive chez la drosophile.

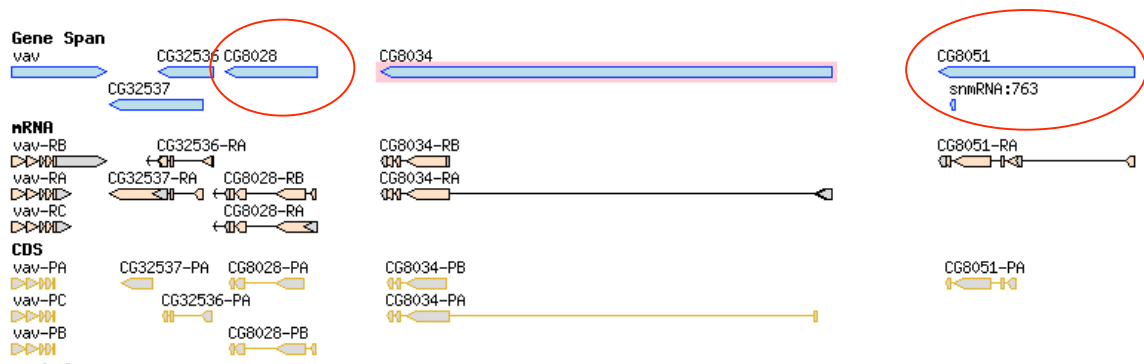


Figure 63 : Région chromosomique de *megad*

Les gènes *CG8028* et *CG8051* sont référencés dans flybase comme des MCT putatifs et possèdent une forte similarité avec *megad* (*CG8034*).

- Si le rôle des MCT et notamment de MCT 2 a été assez largement étudié chez la souris, aucune donnée n'a caractérisé un rôle potentiel dans la formation de la mémoire. L'étude d'un mutant KO pour MCT 2 pourrait permettre de répondre à cette question. Par ailleurs, il est possible de stimuler certaines voies métaboliques chez la souris par l'injection de substances pharmacologiques. Ainsi, la stimulation de la voie du lactate pourrait permettre d'étudier le rôle de cet acide carboxylique dans la neurotransmission et notamment dans le cadre de la formation de la mémoire

- Il est également envisageable d'observer les changements éventuels de traces mnésiques dans un contexte mutant *megad*. Par exemple, la trace mnésique de la MLT dans les lobes verticaux pourrait être plus important, ou apparaître plus précocement.

- Nous pourrions étudier les mécanismes du blocage de la MLT par la MRA. Par exemple, déterminer si la phosphorylation de certains facteurs de transcription jouant un rôle positif sur la formation de la MLT, tels que Creb, est modifiée dans un mutant *megad*.

- La formation de la MLT est facilitée chez le mutant *megad*. Il sera intéressant d'étudier par imagerie calcique si la trace mnésique qui se forme dans le lobe α après conditionnement espacé (Yu et al. 2006) est elle aussi renforcée.

3 Conclusion générale

Mon projet de thèse avait pour but d'identifier des nouveaux réseaux de neurones impliqués dans le rappel de la mémoire olfactive aversive et de nouveaux mutants de MRA, afin de connaître un peu mieux les mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation de cette mémoire.

L'identification des neurones MB-V2, impliqués dans le rappel de tous les types de mémoire olfactive a donc permis de comprendre un peu mieux les mécanismes mis en jeu lors du rappel de la mémoire. L'imagerie *in vivo* devrait révéler plus particulièrement l'ordre séquentielle de la formation de traces mnésiques et le rôle spécifique de certains réseaux neuronaux dans la formation, la consolidation ou le rappel de la mémoire. Par ailleurs, cette découverte offre de nouvelles perspectives de recherche, notamment sur le rôle de la corne latérale dans le rappel de la mémoire olfactive.

L'identification du mutant de MRA *megad* a également permis de répondre à un certain nombre de questions, notamment sur les relations entre les deux types de mémoires consolidées chez la drosophile. Les caractéristiques des fonctions moléculaires et cellulaires restent encore à déterminer. Néanmoins, les pistes ouvertes par cette découverte sont nombreuses et devraient permettre dans les années à venir de comprendre un peu mieux les mécanismes de cette mémoire si particulière qu'est la MRA.

Bibliographie

- Abel, T., Martin, K.C., Bartsch, D., and Kandel, E.R. (1998). Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279, 338-341.
- Akalal, D.B., Wilson, C.F., Zong, L., Tanaka, N.K., Ito, K., and Davis, R.L. (2006). Roles for *Drosophila* mushroom body neurons in olfactory learning and memory. *Learn Mem* 13, 659-668.
- Akaoka, H., Szymocha, R., Beurton-Marduel, P., Bernard, A., Belin, M.F., and Giraudon, P. (2001). Functional changes in astrocytes by human T-lymphotropic virus type-1 T-lymphocytes. *Virus Res* 78, 57-66.
- Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., and Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124, 191-205.
- Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., and Tsien, R.Y. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 260, 222-226.
- Bailey, C.H., Bartsch, D., and Kandel, E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13445-13452.
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851-859.
- Benzer, S. (1955). Fine Structure of a Genetic Region in Bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 344-354.
- Benzer, S. (1962). The fine structure of the gene. *Sci Am* 206, 70-84.
- Benzer, S. (1967). BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 1112-1119.
- Bergersen, L., Waerhaug, O., Helm, J., Thomas, M., Laake, P., Davies, A.J., Wilson, M.C., Halestrap, A.P., and Ottersen, O.P. (2001). A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Exp Brain Res* 136, 523-534.
- Boquet, I., Hitier, R., Dumas, M., Chaminade, M., and Preat, T. (2000). Central brain postembryonic development in *Drosophila*: implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *J Neurobiol* 42, 33-48.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268.
- Boynton, S., and Tully, T. (1992). *latheo*, a new gene involved in associative learning and memory in *Drosophila melanogaster*, identified from P element mutagenesis. *Genetics* 131, 655-672.

Brockmann, K., Dumitrescu, A.M., Best, T.T., Hanefeld, F., and Refetoff, S. (2005). X-linked paroxysmal dyskinesia and severe global retardation caused by defective MCT8 gene. *J Neurol* 252, 663-666.

Brown, A.M., Tekkok, S.B., and Ransom, B.R. (2003). Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol* 549, 501-512.

Byers, D., Davis, R.L., and Kiger, J.A., Jr. (1981). Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289, 79-81.

Byrne, J.H., and Kandel, E.R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16, 425-435.

Carew, T.J., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (1983). Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 219, 397-400.

Castellucci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Wilson, F.D., Nairn, A.C., and Greengard, P. (1980). Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7492-7496.

Cedar, H., Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1972). Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. I. Increased synthesis in response to synaptic stimulation. *J Gen Physiol* 60, 558-569.

Chabaud, M.A., Isabel, G., Kaiser, L. and Preat, T. Social facilitation of long-lasting memory retrieval in *Drosophila*. *Current Biology* (en cours d'acceptation).

Chen, C.N., Denome, S., and Davis, R.L. (1986). Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce+* gene, the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9313-9317.

Chiang, A.S., Blum, A., Barditch, J., Chen, Y.H., Chiu, S.L., Regulski, M., Armstrong, J.D., Tully, T., and Dubnau, J. (2004). radish encodes a phospholipase-A2 and defines a neural circuit involved in anesthesia-resistant memory. *Curr Biol* 14, 263-272.

Collatz, J., Muller, C., and Steidle, J.L. (2006). Protein synthesis-dependent long-term memory induced by one single associative training trial in the parasitic wasp *Lariophagus distinguendus*. *Learn Mem* 13, 263-266.

Colomb, J., Kaiser, L., Chabaud, M.A., and Preat, T. (2009). Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes Brain Behav* 8, 407-415.

Comas, D., Petit, F., and Preat, T. (2004). *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430, 460-463.

Connolly, J.B., Roberts, I.J., Armstrong, J.D., Kaiser, K., Forte, M., Tully, T., and O'Kane, C.J. (1996). Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274, 2104-2107.

- Crittenden, J.R., Skoulakis, E.M., Han, K.A., Kalderon, D., and Davis, R.L. (1998). Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5, 38-51.
- Dash, P.K., Hochner, B., and Kandel, E.R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345, 718-721.
- Davis, R.L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28, 275-302.
- Davis, R.L., and Kiger, J.A., Jr. (1981). Dunce mutants of *Drosophila melanogaster*: mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *J Cell Biol* 90, 101-107.
- de Belle, J.S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263, 692-695.
- Debernardi, R., Pierre, K., Lengacher, S., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003). Cell-specific expression pattern of monocarboxylate transporters in astrocytes and neurons observed in different mouse brain cortical cell cultures. *J Neurosci Res* 73, 141-155.
- Didelot, G., Molinari, F., Tchenio, P., Comas, D., Milhiet, E., Munnich, A., Colleaux, L., and Preat, T. (2006). Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313, 851-853.
- Drain, P., Folkers, E., and Quinn, W.G. (1991). cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* 6, 71-82.
- Drier, E.A., Tello, M.K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T.C., and Yin, J.C. (2002). Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 5, 316-324.
- Dubnau, J. (2003). Neurogenetic dissection of conditioned behavior: evolution by analogy or homology? *J Neurogenet* 17, 295-326.
- Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., *et al.* (2003). The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13, 286-296.
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., and Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476-480.
- Dudai, Y. (1977a). Properties of learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 114, 69-89.
- Dudai, Y. (1977b). Properties of learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 114, 69-89.
- Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., and Benzer, S. (1976). *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1684-1688.

- Dura, J.M., Preat, T., and Tully, T. (1993). Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 9, 1-14.
- Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J.R., and Smith, D.P. (2003). Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J Neurosci* 23, 9906-9912.
- Erber, J., Masuhr, T., Menzel, R. (1980). Localization of short-term memory in the brain of the bee *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5, 343-358.
- Farah, C.A., Weatherill, D., Dunn, T.W., and Sossin, W.S. (2009). PKC differentially translocates during spaced and massed training in aplysia. *J Neurosci* 29, 10281-10286.
- Feany, M.B., and Quinn, W.G. (1995). A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Science* 268, 869-873.
- Ferner, R.E., Hughes, R.A., and Weinman, J. (1996). Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J Neurol Sci* 138, 125-133.
- Ferris, J., Ge, H., Liu, L., and Roman, G. (2006). G(o) signaling is required for *Drosophila* associative learning. *Nat Neurosci* 9, 1036-1040.
- Fiala, A., Muller, U., and Menzel, R. (1999). Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Neurosci* 19, 10125-10134.
- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.M., Buchner, E., and Galizia, C.G. (2002). Genetically expressed *cameleon* in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr Biol* 12, 1877-1884.
- Folkers, E., Drain, P., and Quinn, W.G. (1993). *Radish*, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8123-8127.
- Folkers, E., Waddell, S., and Quinn, W.G. (2006). The *Drosophila radish* gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17496-17500.
- Friesema, E.C., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P., and Visser, T.J. (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278, 40128-40135.
- Friggi-Grelin, F., Coulom, H., Meller, M., Gomez, D., Hirsh, J., and Birman, S. (2003). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 54, 618-627.
- Gao, Q., Yuan, B., and Chess, A. (2000). Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3, 780-785.
- Ge, X., Hannan, F., Xie, Z., Feng, C., Tully, T., Zhou, H., and Zhong, Y. (2004). Notch signaling in *Drosophila* long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10172-10176.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., and Mansuy, I.M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970-975.

- Goldman, A.L., Van der Goes van Naters, W., Lessing, D., Warr, C.G., and Carlson, J.R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* *45*, 661-666.
- Goodwin, S.F., Del Vecchio, M., Velinzon, K., Hogel, C., Russell, S.R., Tully, T., and Kaiser, K. (1997). Defective learning in mutants of the *Drosophila* gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* *17*, 8817-8827.
- Grunbaum, L., and Muller, U. (1998). Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci* *18*, 4384-4392.
- Grunewald, B. (1999). Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* *404*, 114-126.
- Grünwald, B. (1999). Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* *185*, 565-576
- Guo, H.F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L., and Zhong, Y. (2000). A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* *403*, 895-898.
- Halestrap, A.P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* *447*, 619-628.
- Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 59-63.
- Hammer, M., and Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci* *15*, 1617-1630.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., and Hannon, G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* *2*, 110-119.
- Han, P.L., Levin, L.R., Reed, R.R., and Davis, R.L. (1992). Preferential expression of the *Drosophila rutabaga* gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* *9*, 619-627.
- Hannan, F., Ho, I., Tong, J.J., Zhu, Y., Nurnberg, P., and Zhong, Y. (2006). Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenylyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. *Hum Mol Genet* *15*, 1087-1098.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A., and Stocker, R.F. (2001). A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15336-15341.
- Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* *2*, 1-30.

- Ho, I.S., Hannan, F., Guo, H.F., Hakker, I., and Zhong, Y. (2007). Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci* 27, 6852-6857.
- Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T., and Saitoe, M. (2008). Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20976-20981.
- Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22, 6781-6789.
- Ikeda, S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255-258.
- Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024-1027.
- Isabel, G., Preat, T. (2008). Molecular and System Analysis of Olfactory Memory in *Drosophila*. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (J.Byrne Editor, Oxford: Elsevier) 4.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.
- Ito, K., Okada, R., Tanaka, N.K., and Awasaki, T. (2003). Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microsc Res Tech* 62, 170-186.
- Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D., and Strausfeld, N.J. (1998). The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5, 52-77.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., and Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635-636.
- Jang, C., Lee, G., and Chung, J. (2008). LKB1 induces apical trafficking of Silnoo, a monocarboxylate transporter, in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 183, 11-17.
- Jefferis, G.S., Marin, E.C., Stocker, R.F., and Luo, L. (2001). Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414, 204-208.
- Jefferis, G.S., Potter, C.J., Chan, A.M., Marin, E.C., Rohlfsing, T., Maurer, C.R., Jr., and Luo, L. (2007). Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128, 1187-1203.
- Joiner, W.J., Crocker, A., White, B.H., and Sehgal, A. (2006). Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* 441, 757-760.
- Kandel, E.R., and Schwartz, J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218, 433-443.

- Kandel, E.R., and Tauc, L. (1965). Mechanism of heterosynaptic facilitation in the giant cell of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J Physiol* *181*, 28-47.
- Keene, A.C., Krashes, M.J., Leung, B., Bernard, J.A., and Waddell, S. (2006). *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* *16*, 1524-1530.
- Keene, A.C., Stratmann, M., Keller, A., Perrat, P.N., Vosshall, L.B., and Waddell, S. (2004). Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* *44*, 521-533.
- Keene, A.C., and Waddell, S. (2007). *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* *8*, 341-354.
- Kelleher, R.J., 3rd, Govindarajan, A., and Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* *44*, 59-73.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* *18*, 896-898.
- Kidd, S., Lieber, T., and Young, M.W. (1998). Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes Dev* *12*, 3728-3740.
- Kim, Y.C., Lee, H.G., and Han, K.A. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci* *27*, 7640-7647.
- Kim, Y.C., Lee, H.G., Seong, C.S., and Han, K.A. (2003). Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns* *3*, 237-245.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J Neurobiol* *47*, 81-92.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 2112-2116.
- Krashes, M.J., Keene, A.C., Leung, B., Armstrong, J.D., and Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron* *53*, 103-115.
- Krashes, M.J., and Waddell, S. (2008). Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *J Neurosci* *28*, 3103-3113.
- Kurosinski, P., and Gotz, J. (2002). Glial cells under physiologic and pathologic conditions. *Arch Neurol* *59*, 1524-1528.
- Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., and Vosshall, L.B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* *43*, 703-714.

- Lee, T., Lee, A., and Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* *126*, 4065-4076.
- Li, W., Tully, T., and Kalderon, D. (1996). Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem* *2*, 320-333.
- Li, Y., and Strausfeld, N.J. (1997). Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J Comp Neurol* *387*, 631-650.
- Lin, H.H., Lai, J.S., Chin, A.L., Chen, Y.C., and Chiang, A.S. (2007). A map of olfactory representation in the *Drosophila* mushroom body. *Cell* *128*, 1205-1217.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M., and Liu, L. (2006). Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* *439*, 551-556.
- Liu, L., Wolf, R., Ernst, R., and Heisenberg, M. (1999). Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* *400*, 753-756.
- Liu, X., Buchanan, M.E., Han, K.A., and Davis, R.L. (2009). The GABA_A receptor RDL suppresses the conditioned stimulus pathway for olfactory learning. *J Neurosci* *29*, 1573-1579.
- Liu, X., and Davis, R.L. (2009). The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nat Neurosci* *12*, 53-59.
- Liu, X., Krause, W.C., and Davis, R.L. (2007). GABA_A receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron* *56*, 1090-1102.
- Livingstone, M.S., Sziber, P.P., and Quinn, W.G. (1984). Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* *37*, 205-215.
- Lu, Y., Lu, Y.S., Shuai, Y., Feng, C., Tully, T., Xie, Z., Zhong, Y., and Zhou, H.M. (2007). The AKAP Yu is required for olfactory long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13792-13797.
- Magistretti, P.J., Sorg, O., Yu, N., Martin, J.L., and Pellerin, L. (1993). Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci* *15*, 306-312.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T.V., Vanhoose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., and Mansuy, I.M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* *104*, 675-686.
- Mank, M., Reiff, D.F., Heim, N., Friedrich, M.W., Borst, A., and Griesbeck, O. (2006). A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* *90*, 1790-1796.
- Mao, Z., Roman, G., Zong, L., and Davis, R.L. (2004). Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 198-203.

- Marin, E.C., Jefferis, G.S., Komiyama, T., Zhu, H., and Luo, L. (2002). Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* *109*, 243-255.
- Martin, J.R., Ernst, R., and Heisenberg, M. (1998). Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* *5*, 179-191.
- Mauelshagen, J. (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* *69*, 609-625.
- McBride, S.M., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., and Siwicki, K.K. (1999). Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* *24*, 967-977.
- McGuire, S.E., Deshazer, M., and Davis, R.L. (2005). Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* *76*, 328-347.
- McGuire, S.E., Le, P.T., and Davis, R.L. (2001). The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* *293*, 1330-1333.
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* *302*, 1765-1768.
- Mehren, J.E., Ejima, A., and Griffith, L.C. (2004). Unconventional sex: fresh approaches to courtship learning. *Curr Opin Neurobiol* *14*, 745-750.
- Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* *8*, 53-62.
- Menzel, R., Erber, J., and Masuhr, T. (1974). Learning and memory in the honeybee. *Experimental Analysis of Insect Behaviour (Barton-Brown L ediions)*, 195-217.
- Menzel, R., and Manz, G. (2005). Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *J Exp Biol* *208*, 4317-4332.
- Menzel, R., and Sugawa, M. (1986). Time course of short-term memory depends on associative events. *Naturwissenschaften* *73*, 564-565.
- Mery, F., and Kawecki, T.J. (2002). Experimental evolution of learning ability in fruit flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14274-14279.
- Mery, F., and Kawecki, T.J. (2005). A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* *308*, 1148.
- Mery, F., Pont, J., Preat, T., and Kawecki, T.J. (2007). Experimental evolution of olfactory memory in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Biochem Zool* *80*, 399-405.
- Miesenbock, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* *394*, 192-195.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2135-2140.

- Molinari, F., Meskenaite, V., Munnich, A., Sonderegger, P., and Colleaux, L. (2003). Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Hum Mol Genet* *12 Spec No 2*, R195-200.
- Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., *et al.* (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* *298*, 1779-1781.
- Muller, U. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron* *16*, 541-549.
- Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J.F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005). Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* *15*, 2279-2284.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* *19*, 137-141.
- Nakamura, T., Kurokawa, K., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2006). Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol* *406*, 315-332.
- Neckameyer, W.S. (1998). Dopamine and mushroom bodies in *Drosophila*: experience-dependent and -independent aspects of sexual behavior. *Learn Mem* *5*, 157-165.
- Nighorn, A., Healy, M.J., and Davis, R.L. (1991). The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* *6*, 455-467.
- Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature* *430*, 161-164.
- Okada, R., Rybak, J., Manz, G., and Menzel, R. (2007). Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *J Neurosci* *27*, 11736-11747.
- Olson, D.M., Rains, G.C., Meiners, T., Takasu, K., Tertuliano, M., Tumlinson, J.H., Wackers, F.L., and Lewis, W.J. (2003). Parasitic wasps learn and report diverse chemicals with unique conditionable behaviors. *Chem Senses* *28*, 545-549.
- Parisky, K.M., Agosto, J., Pulver, S.R., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J.J., Kang, K., Liu, X., Garrity, P.A., Rosbash, M., and Griffith, L.C. (2008). PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* *60*, 672-682.
- Pascual, A., Huang, K.L., Neveu, J., and Preat, T. (2004). Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory. *Nature* *427*, 605-606.
- Pascual, A., and Preat, T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* *294*, 1115-1117.
- Pavlopoulos, E., Anezaki, M., and Skoulakis, E.M. (2008). Neuralized is expressed in the alpha/beta lobes of adult *Drosophila* mushroom bodies and facilitates olfactory long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 14674-14679.

- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K.M., Muskavitch, M.A., Moschonas, N.K., and Delidakis, C. (2001). *neuralized* Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* *1*, 807-816.
- Pellerin, L., Bergersen, L.H., Halestrap, A.P., and Pierre, K. (2005). Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* *79*, 55-64.
- Perazzona, B., Isabel, G., Preat, T., and Davis, R.L. (2004). The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *J Neurosci* *24*, 8823-8828.
- Philip, N., Acevedo, S.F., and Skoulakis, E.M. (2001). Conditional rescue of olfactory learning and memory defects in mutants of the 14-3-3zeta gene *leonardo*. *J Neurosci* *21*, 8417-8425.
- Pierre, K., Debernardi, R., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003). Noradrenaline enhances monocarboxylate transporter 2 expression in cultured mouse cortical neurons via a translational regulation. *J Neurochem* *86*, 1468-1476.
- Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* *94*, 1-14.
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., and Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* *167*, 1740-1742.
- Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P., and Allada, R. (2006). A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* *441*, 753-756.
- Preat, T. (1998). Decreased odor avoidance after electric shock in *Drosophila* mutants biases learning and memory tests. *J Neurosci* *18*, 8534-8538.
- Presente, A., Boyles, R.S., Serway, C.N., de Belle, J.S., and Andres, A.J. (2004). Notch is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1764-1768.
- Quinn, W.G., and Dudai, Y. (1976). Memory phases in *Drosophila*. *Nature* *262*, 576-577.
- Quinn, W.G., Harris, W.A., and Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 708-712.
- Quinn, W.G., Sziber, P.P., and Booker, R. (1979). The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* *277*, 212-214.
- Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E., and Fiala, A. (2005). Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* *15*, 1953-1960.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., *et al.* (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* *287*, 2204-2215.
- Rybak, J., and Menzel, R. (1998). Integrative properties of the *Pe1* neuron, a unique mushroom body output neuron. *Learn Mem* *5*, 133-145.

- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schroll, C., Riemensperger, T., Bucher, D., Ehmer, J., Voller, T., Erbguth, K., Gerber, B., Hendel, T., Nagel, G., Buchner, E., and Fiala, A. (2006). Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Curr Biol* 16, 1741-1747.
- Schurr, A., West, C.A., and Rigor, B.M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240, 1326-1328.
- Schwaerzel, M., Heisenberg, M., and Zars, T. (2002). Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35, 951-960.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., and Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23, 10495-10502.
- Schwarz, M., and Muller, U. (2006). Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell Mol Life Sci* 63, 989-998.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286, 741-746.
- Shang, Y., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2008). Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19587-19594.
- Siegel, R.W., and Hall, J.C. (1979). Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3430-3434.
- Silva, A.J., Frankland, P.W., Marowitz, Z., Friedman, E., Laszlo, G.S., Cioffi, D., Jacks, T., and Bourchouladze, R. (1997). A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. *Nat Genet* 15, 281-284.
- Sinakevitch, I., and Strausfeld, N.J. (2006). Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol* 494, 460-475.
- Skoulakis, E.M., and Davis, R.L. (1996). Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron* 17, 931-944.
- Skoulakis, E.M., Kalderon, D., and Davis, R.L. (1993). Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11, 197-208.
- Smid, H.M., Wang, G., Bukovinszky, T., Steidle, J.L., Bleeker, M.A., van Loon, J.J., and Vet, L.E. (2007). Species-specific acquisition and consolidation of long-term memory in parasitic wasps. *Proc Biol Sci* 274, 1539-1546.
- Stocker, R.F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275, 3-26.

- Stocker, R.F., Heimbeck, G., Gendre, N., and de Belle, J.S. (1997). Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *J Neurobiol* *32*, 443-456.
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., and Ito, K. (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem* *5*, 11-37.
- Strausfeld, N.J., Sinakevitch, I., and Vilinsky, I. (2003). The mushroom bodies of *Drosophila melanogaster*: an immunocytological and golgi study of Kenyon cell organization in the calyces and lobes. *Microsc Res Tech* *62*, 151-169.
- Struhl, G., and Adachi, A. (1998). Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* *93*, 649-660.
- Sweeney, S.T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., and O'Kane, C.J. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* *14*, 341-351.
- Takata, T., Sakurai, T., Yang, B., Yokono, K., and Okada, Y. (2001). Effect of lactate on the synaptic potential, energy metabolism, calcium homeostasis and extracellular glutamate concentration in the dentate gyrus of the hippocampus from guinea-pig. *Neuroscience* *104*, 371-378.
- Tanaka, N.K., Awasaki, T., Shimada, T., and Ito, K. (2004). Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Curr Biol* *14*, 449-457.
- Tanaka, N.K., Tanimoto, H., and Ito, K. (2008). Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* *508*, 711-755.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., and Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* *401*, 63-69.
- Tempel, B.L., Bonini, N., Dawson, D.R., and Quinn, W.G. (1983). Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 1482-1486.
- Thum, A.S., Jenett, A., Ito, K., Heisenberg, M., and Tanimoto, H. (2007). Multiple memory traces for olfactory reward learning in *Drosophila*. *J Neurosci* *27*, 11132-11138.
- Tompkins, L., Siegel, R.W., Gailey, D.A., and Hall, J.C. (1983). Conditioned courtship in *Drosophila* and its mediation by association of chemical cues. *Behav Genet* *13*, 565-578.
- Tomsic, D., de Astrada, M.B., Sztarker, J., and Maldonado, H. (2009). Behavioral and neuronal attributes of short- and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* *92*, 176-182.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* *79*, 35-47.
- Tully, T., and Quinn, W.G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* *157*, 263-277.

- Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E1127-1134.
- Vosshall, L.B., Wong, A.M., and Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147-159.
- Waddell, S., Armstrong, J.D., Kitamoto, T., Kaiser, K., and Quinn, W.G. (2000). The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103, 805-813.
- Wang, Y., Chiang, A.S., Xia, S., Kitamoto, T., Tully, T., and Zhong, Y. (2003). Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Curr Biol* 13, 1900-1904.
- Wang, Y., Guo, H.F., Pologruto, T.A., Hannan, F., Hakker, I., Svoboda, K., and Zhong, Y. (2004). Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca²⁺ imaging. *J Neurosci* 24, 6507-6514.
- Wang, Y., Mamiya, A., Chiang, A.S., and Zhong, Y. (2008). Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci* 28, 4368-4376.
- Wittstock, S., Kaatz, H.H., and Menzel, R. (1993). Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning. *J Neurosci* 13, 1379-1386.
- Wolf, R., and Heisenberg, M. (1990). Visual control of straight flight in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 167, 269-283.
- Wong, A.M., Wang, J.W., and Axel, R. (2002). Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* 109, 229-241.
- Wu, C.L., Xia, S., Fu, T.F., Wang, H., Chen, Y.H., Leong, D., Chiang, A.S., and Tully, T. (2007). Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nat Neurosci* 10, 1578-1586.
- Wustenberg, D., Gerber, B., and Menzel, R. (1998). Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci* 10, 2742-2745.
- Wustmann, G., Rein, K., Wolf, R., and Heisenberg, M. (1996). A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 179, 429-436.
- Yamada, Y., Davis, K.D., and Coffman, C.R. (2008). Programmed cell death of primordial germ cells in *Drosophila* is regulated by p53 and the Outsiders monocarboxylate transporter. *Development* 135, 207-216.
- Yamagata, N., Nishino, H., and Mizunami, M. (2007). Neural pathways for the processing of alarm pheromone in the ant brain. *J Comp Neurol* 505, 424-442.

- Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H., and Tully, T. (1995a). CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* *81*, 107-115.
- Yin, J.C., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H., Quinn, W.G., and Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* *79*, 49-58.
- Yin, J.C., Wallach, J.S., Wilder, E.L., Klingensmith, J., Dang, D., Perrimon, N., Zhou, H., Tully, T., and Quinn, W.G. (1995b). A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol Cell Biol* *15*, 5123-5130.
- Yu, D., Akalal, D.B., and Davis, R.L. (2006). *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* *52*, 845-855.
- Yu, D., Keene, A.C., Srivatsan, A., Waddell, S., and Davis, R.L. (2005). *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* *123*, 945-957.
- Yu, D., Ponomarev, A., and Davis, R.L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* *42*, 437-449.
- Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A.C., and Kravitz, E.A. (2006). Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 17519-17524.
- Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., and Heisenberg, M. (2000). Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* *288*, 672-675.
- Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14997-15002.
- Zhao, H., Zheng, X., Yuan, X., Wang, L., Wang, X., Zhong, Y., Xie, Z., and Tully, T. (2009). *ben* Functions with *scamp* during synaptic transmission and long-term memory formation in *Drosophila*. *J Neurosci* *29*, 414-424.