



HAL
open science

Recherche de nouveaux mutants de mémoire à long terme chez la drosophile

Benjamin Kottler

► **To cite this version:**

Benjamin Kottler. Recherche de nouveaux mutants de mémoire à long terme chez la drosophile. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . pastel-00567107

HAL Id: pastel-00567107

<https://pastel.hal.science/pastel-00567107>

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.

« La mémoire est nécessaire à toutes les opérations de l'esprit... »

Pascal



"La Mémoire " (1945) par René Magritte

Avec la fin de cette thèse, je clôture un chapitre de quasiment 5 ans de ma vie. 5 ans où j'ai énormément appris, sur moi et sur les autres, et que je n'oublierai pas. Des moments forts, des moments pénibles, des joies et des déceptions, j'aurai tout vu et tout connu avec cette thèse. Combien de fois ai-je pensé au petit Gibus à me dire « Si j'aurais su, j'aurais pas venu »...

Je remercie en premier lieu les membres du jury qui ont évalué ce travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Thomas Prémat, qui m'a toujours conseillé et soutenu. Je sais maintenant ce qu'est un scientifique et ce que cela implique. Je n'oublierai rien de tout ce que j'ai appris grâce à toi.

Il s'agissait de ma première expérience professionnelle, mais aussi de mes débuts dans le monde de la science. Et je le dois à la confiance que m'a affichée dès mes débuts, Philippe Silar, qui m'a soutenu depuis la maîtrise, en passant par le DEA, jusqu'à la fin de ma thèse. Je tiens également à remercier celle qui a guidé mes premiers pas de drosophiliste et avec qui j'ai publié mon premier article : Régine Terracol.

Je remercie chaleureusement Giuseppe Baldacci et Marie-Joe Daboussi pour leur écoute attentive, leurs conseils, leur soutien.

Je remercie également Philippe Vernier pour m'avoir accueilli à Gif sur Yvette. Gif sur Yvette fut une période inoubliable pour moi. Ses quatre heures quotidiennes dans les transports en communs, le froid et la boue l'hiver, la pelouse et les canards plus vraiment sauvages l'été. Que du bonheur. Je pense à ceux que j'ai rencontrés là-bas. Maryline et Sandro, les fous furieux de l'étage du dessus qui font joujou avec des chats, Gilles et Joao, et Stéphanie. Toutes les techniciennes sans qui notre travail ne serait pas possible. Bien évidemment de cette période, je pense à Bertrand l'inimitable et Julie l'exceptionnelle que je tiens en estime, mais aussi à Anne, Baptiste, Hélène, Johana, et Marie-Emilie. Et comment oublier celui qui fut une sorte de mentor pour moi, à mes débuts, Daniel Comas, fier catalan dont j'ai appris plus que je ne le devais à son contact, ainsi que Gérard et qui a su toujours rester un modèle digne de thésard.

Je salue chaleureusement ceux que j'ai rencontrés lors du congrès de Leuven, Yesser et Simona et particulier.

Puis nous avons déménagé à Paris, et j'ai fait d'autres rencontres. Dans un contexte difficile j'ai rencontré des personnes de grande qualité. Karine, et Jack, et Quentin et Isabelle, et Sophie et Julien. Sans oublier Marcel et Sylvie. Merci de votre soutien lors des moments délicats que j'ai eu à vivre au sein de ce nouveau laboratoire.

Et cette école, son bar étudiant, ses étudiants, ses soirées arrosées. L'équipe des navy blues de l'ESPCI. Et quand je pense équipe, je pense LGE. Merci à la LGE d'avoir existé, merci à vous tous de m'avoir permis de sortir et de me défouler en courant après un ballon.

5 ans dans cette équipe et 5 ans de vie commune avec certains. En premier lieu Guillaume, sa dopamine, sa bonne humeur. Je n'oublie pas les moments difficiles que nous avons passés ensemble, ton courage dans l'adversité, et sache que je prie pour que tu aies un poste que tu mérites depuis trop longtemps. Merci Michel, pour ta façon de relativiser les choses, ton sourire, tu es notre père à tous. Merci Jeune Julien pour ton mutant de ARM, ta taille de géant, tes clopes taxées et re-taxées et re-re-taxées... Julien le Suisse, ta bonne humeur, tes expressions bizarres, ta grosse voie, ton humilité, ta modestie et ton leadership. Nicolas, ton imagerie, tes MBs qui brillent, tes scores de mémoire défiant l'entendement, ton approche de la science. Eric, je sens qu'on aurait bien rigolé ensemble. Et merci Niki, maudit anglais, sans qui j'aurais tout simplement pétié les plombs. Merci de ton soutien, de tes conseils, de tout. Et puis aussi Kai-Luan, Anne-Laure, et Marie-Ange, bon courage à toute les trois. Merci à Annie et tous tes prédécesseurs à la cuisine sans qui nous ne pourrions travailler. Nous vous devons beaucoup. Et puis comment oublier l'incroyable Paul. Un mystère, une légende, un modèle.

Merci aussi à tous mes potes et amis, qui m'ont apporté leur soutien moral au cours de toutes ces années. Merci Sandro, Arno, Aurel, Carm, Anne-Claire, Carole, Ben, Johanna et tous les autres...

Merci également aux collègues de DEA, Mathieu et Julie, Jessie, Xavier dont je dois être le dernier représentant non docteur. Je n'ai que des bons souvenirs avec vous.

Merci à ma famille, à mon père, à ma mère, à mon frère, à ma sœur, à mes grands-parents. Merci de votre soutien, et de la confiance que vous avez eue en moi ; j'espère vous rendre fier de ce que j'ai fait.

Merci à Julie d'avoir supporté mes sautes d'humeur, et mes crises d'angoisse.

Table des matières

INDEX DES FIGURES.....	p11
TABLE DES ABBRÉVIATIONS.....	p15
Résumé.....	p17
INTRODUCTION.....	p19
A Historique du concept de mémoire.....	p21
<u>1 Définition et premières considérations.....</u>	<u>p21</u>
a- Descartes ou les règles pour la direction de l'esprit	p21
b- Bergson ou le problème du corps et de l'esprit.....	p22
<u>2 De la mémoire organique à l'étude de la mémoire organique</u>	<u>p23</u>
<u>3 Un ensemble de « connexions ». Les voies nerveuses de Théodule Ribot et de Donald Hebb</u>	<u>p24</u>
<u>4 Naissance de la biologie de la mémoire</u>	<u>p25</u>
a..Les premières oppositions à la mémoire organique	p25
b..Premières considérations scientifiques sur la mémoire	p25
<u>5 Les réseaux neuronaux et la plasticité.....</u>	<u>p26</u>
<u>6 Le « béhaviorisme » : l'apport d'Ivan Pavlov et du conditionnement.....</u>	<u>p29</u>
B Intérêt de la drosophile	p33
<u>I Conservation des gènes homme/drosophile.....</u>	<u>p33</u>
<u>II La puissance de la drosophile comme animal modèle.....</u>	<u>p34</u>
<u>III Les limites de la drosophile.....</u>	<u>p37</u>
<u>IV Les différents comportements.....</u>	<u>p38</u>
a- La parade.....	p38
b- Ajustement du vol de la drosophile en fonction des stimuli visuels perçus.....	p39
c- La mémoire olfactive.....	p42
d- Calcul du score ou indice de performance.....	p42
C La mémoire olfactive chez la drosophile.....	p45
<u>I Les différentes phases de mémoire.....</u>	<u>p45</u>
a- L'apprentissage.....	p45
b- La mémoire à court terme.....	p45
c- La mémoire à moyen terme.....	p46
d- « Les mémoires consolidés » MRA et MLT.....	p46
<u>II Le système nerveux central de la drosophile.....</u>	<u>p49</u>
L'ablation chimique des corps pédonculés abolit l'apprentissage et la mémoire olfactive... p50	
<u>III Une structure particulière : les corps pédonculés.....</u>	<u>p50</u>
a- Description.....	p50
b- Développement des corps pédonculés.....	p52
<u>IV Intégration des informations olfactives</u>	<u>p53</u>
<u>V D'autres structures impliquées dans la mémoire.....</u>	<u>p55</u>
a- Les DPM	p55
b- Les cellules gliales.....	p55
c- Autres structure.....	p55
d- L'ellipsoid body	p55
e- Les neurones dopaminergiques	p56
<u>VI La mise en place de la mémoire olfactive au sein des corps pédonculés fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires.....</u>	<u>p56</u>
a- La voie de l'AMPC.....	p57

Dunce (dnc).....	p57
Rutabaga (rut).....	p57
PKA.....	p58
CREB.....	p59
Amnesiac (amn) et les DPM.....	p60
NF1.....	p61
b- Les molécules d'adhésion cellulaire et les récepteurs membranaires.....	p61
Volado (Vol).....	p61
Fasciclin II (Fas II).....	p62
Notch (N).....	p62
c- Les autres gènes.....	p63
PKM atypique (aPKM).....	p63
Leonardo (leo).....	p65
Nalyot	p65
Radish (rsh)	p65
La voie Staufén/Pumilio	p66
Le complexe RNAi	p67
Nebula (nla)	p67
Crammer (cer).....	p68
Les synapsines	p68
S6KII	p69
Latheo (lat)	p69
Linotte (lio)	p70
Tequila (teq)	p70
<u>VII Acquisition, stockage, restitution et dynamique des phases de mémoire.....</u>	<u>p72</u>
a- Les lobes antennaires apparaissent comme étant le premier site de d'intégration de l'information.....	p72
b- Les corps pédonculés sont le site majeur de la formation de la mémoire olfactive.....	p73
c- La dynamique des phases de mémoire.....	p79
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	p85
<u>A Elevage des mouches.....</u>	<u>p87</u>
<u>B Biologie Moléculaire.....</u>	<u>p88</u>
I La PCR-Rescue.....	p88
Extraction d'ADN pour PCR-Rescue	p88
Digestion de l'ADN total pour PCR-Rescue	p89
Ligation pour PCR-Rescue	p89
PCR pour PCR-Rescue.....	p89
II Extraction d'ADN pour amplifier des fragments d'ADN	p90
III Construction des lignées pUAS-RNAi	p90
Principe du RNAi.....	p90
Technique de construction du RNAi	p91
Construction de la séquence inversée-répétée	p92
Choix des oligos.....	p94
Transgénèse	p94
IV Northern blot.....	p95
Préparation des échantillons.....	p95
Migration des échantillons.....	p95
Transfert.....	p96
Hybridation	p96

Synthèse des sondes et transcription inverse.....	p97
V Western blot	p98
Extraction des échantillons.....	p98
Migration et transfert	p98
Traitement de la membrane	p98
VI RT-PCRq.....	p99
Principe	p99
Conditionnement	p100
Extraction d'ARN	p100
Protocole.....	p100
Choix des oligos	p101
Validation des expériences de RT-PCRq.....	p103
VII Comportement.....	p104
Elevages et croisements	p104
Préparation des mouches avant le conditionnement	p104
Préparation des odeurs	p104
Le conditionnement pour la MLT	p105
La phase de test de la MLT	p107
Les autres phases de mémoire.....	p108
Importance des contrôles.....	p108
C <u>Histologie</u>	p109
Coupes paraffine de cerveaux adultes	p109
Immunohistochimie	p109
D <u>Analyse statistique</u>	p110
RESULTATS	p111
I Crible comportemental	p113
A Bilan MLT après outcross	p115
B MCT sur outcross.....	p116
C Massé sur outcross.....	p117
D Olfaction 1.....	p118
E Olfaction 2.....	p119
F Sensibilité aux chocs électriques.....	p120
Bilan comportementale.....	p120
II Identification des sites d'insertion et des gènes touchés	p122
Gal4027.....	p122
72Y.....	p122
III Patron d'expression du Gal4	p126
IV Qualité des transcrits	p128
Analyse des transcrits du gène CG5630.....	p128
Analyse des transcrits du gène CG31191.....	p129
Analyse des transcrits du gène CG11371.....	p131
Bilan de l'analyse des transcrits.....	p131

V Autres lignées Gal4	p133
VI Intégrité du cerveau	p136
VII Variation après conditionnement	p139
Variation des gènes CG31191 et CG5630.....	p140
Variation de Debra	p142
VIII RNAi	p143
Gal 4027.....	p145
Debra RNAi.....	p151
Contrôle des expériences switch	p153
Sur-expression de la protéine	p154
Les contrôles comportementaux	p157
sensibilité aux chocs électriques	p157
Étude de l'olfaction.....	p158
IX Western blot	p159
DISCUSSION	p163
Le mutant Gal4027.....	p163
Le gène debra.....	p170
Annexe 1.....	p175
Références bibliographiques	p183

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du « simulateur de vol »

Figure 2 : Protocole d'apprentissage olfactif par renforcement négatif chez la drosophile

Figure 3 : Importance de la synthèse protéique pour la MLT

Figure 4 : Durée de vie des différentes phases de mémoire

Figure 5 : Courbes de rétention des phases de mémoire

Figure 6 : Schéma des neurones des corps pédonculés

Figure 7 : Schéma du développement des corps pédonculés

Figure 8 : Schéma de la structure des corps pédonculés

Figure 9 : Schéma d'intégration des informations olfactives par le système nerveux

Figure 10 : Modèle cellulaire et moléculaire de formation de la mémoire olfactive chez la drosophile

Figure 11 : Effet du blocage synaptique de la sortie des corps pédonculés sur la mémoire olfactive.

Figure 12 : La sortie des neurones a'/b' est requise pour l'acquisition et la consolidation de la mémoire aversive.

Figure 13 : Les mutants ala présentent des défauts spécifiques

Figure 14 : Les mémoires consolidées impliquent les mêmes groupes de neurones

Figure 15 : Modèle initial de la dynamique des phases de mémoire

Figure 16 : MRA normale chez Rutabaga

Figure 17 : Plus les individus ala sans lobes α/α' apprennent intensément, et moins ils retiennent

Figure 18 : Nouveau modèle de dynamique des phases de mémoire

Figure 19 : Représentation schématique du mécanisme du RNAi

Figure 20 : Principe génétique de l'activation des RNAi

Figure 21 : Représentation du MSC dans le vecteur pWIZ

Figure 22 : Principe de construction de RNAi à partir du vecteur pWIZ

Figure 23 : Principe de la RT-PCR

Figure 24 : Dispositif pour tester la sensibilité aux chocs électriques

Figure 25 : Etude de la mémoire à long terme chez les 11 mutants putatifs

Figure 26 : Etude de la mémoire à court terme chez les mutants sélectionnés

Figure 27 : Etude de la MRA chez les mutants sélectionnés

Figure 28 : Etude de l'olfaction, et de la sensibilité à l'Octanol

Figure 29 : Etude de l'olfaction, et de la sensibilité au méthylcyclohexanol

Figure 30 : Etude de la sensibilité aux chocs électriques chez les mutants de MLT

Figure 31 : Cartographie de Gal 4027

Figure 32 : Cartographie de 72Y

Figure 33 : Vérification par PCR des sites d'insertion

Figure 34 : Patron d'expression de CD8-GFP X 72Y

Figure 35 : Patron d'expression de CD8-GFP X Gal4027

Figure 36 : Étude des transcrits du gène CG5630

Figure 37 : Étude des transcrits du gène CG31191

Figure 38 : Étude des transcrits du gène Debra

Figure 39 : Etude de la MLT des nouvelles lignées

Figure 40 : Etude la MRA des nouvelles lignées

Figure 41 : Etude de la MCT des nouvelles lignées

Figure 42 : Étude de l'anatomie de la lignée 72Y affectant le gène *dbr*

Figure 43 : Zoom sur le marquage DCO pour la lignée 72Y

Figure 44 : Étude de l'anatomie de la lignée *Gal4027* affectant le gène CG5630

Figure 45 : Zoom sur le marquage FasII pour la lignée *Gal4027*

Figure 46 : Étude de la variation du transcrit du gène CG31191 par RT-PCRq :

Figure 47 : Étude de la variation du transcrit du gène CG5630 par RT-PCRq :

Figure 48 : Étude de la variation du transcrit du gène *debra* par RT-PCRq :

Figure 49 : Localisation des RNAis

Figure 50 : Étude de la MLT chez des individus exprimant les RNAis contre CG5630 et CG31191 chez l'adulte et au cours du développement.

Figure 51 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi chez l'adulte et au cours du développement

Figure 52 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi chez l'adulte et au cours du développement

Figure 53 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte

Figure 54 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte

Figure 55 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte

Figure 56 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte

Figure 57 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte

Figure 58 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte

Figure 59: Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte avec ou sans RU

Figure 60: Étude comportementale lors de la sur expression de *Debra* tout au long du développement et chez l'adulte

Figure 61: Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le l'UAS de *dbr* uniquement à l'état adulte :

Figure 62: Étude de MRA chez des individus exprimant l'UAS uniquement à l'état adulte

Figure 63: Étude de la MCT chez des individus surexprimant *dbr* uniquement à l'état adulte

Figure 64: étude de la sensibilité aux chocs électriques chez les individus exprimant les RNAis uniquement à l'état adulte

Figure 65: Étude de l'olfaction, et de la sensibilité au MCH

Figure 66: Étude de l'olfaction, et de la sensibilité à l'Octanol

Figure 67: western blot sur des extraits de tête de mouche :

Figure 68 : Diagramme des interactions supposées de CG5630 avec CG12432, et Tango2 avec d'autres gènes.

Figure 69 : Devenir de Ci en fonction de la présence de signal Hh.

Figure 70: Éléments clés de la voie de signalisation Hh, et intervention de Dbr.

Figure 71: Diagramme des interactions supposées de *dbr* avec *Ets97D*, et de *Ets97D* avec d'autres gènes.

Figure 72: contrôle des expériences de comportement concernant CG31191

Figure 73 : contrôle des expériences de comportement concernant CG5630

Figure 74 : contrôle des expériences de comportement concernant *Debra*

Figure 75 : Diagramme des interactions supposées de CG31191 avec *sec5*, et de *dpr9*

Figure 76 : Diagramme des interactions supposées de *sec5*

Figure 77 : diagramme des interactions de *dpr9*

TABLE DES ABBRÉVIATIONS

MLT	Mémoire à Long Terme
MMT	Mémoire à Moyen Terme
MTM	Middle Term Memory
MCT	Mémoire à Court Terme
MRA	Mémoire Résistante à l'Anesthésie
RNAi	RNA interference ou Interférence à ARN
CREB	cAMP-Response Element Binding
PKA	Protéine Kinase AMPc dépendante
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
cDNA	ADN complémentaire
DPM	Dorsal Paired Medial Neuron
PN	Projection neuron
<i>Shi^{ts}</i>	Shibire thermosensible
CPs	Corps Pédonculés
Pb	paire de base
RNA _m	Messenger ribonucleic acid, ou ARN messenger
siRNA	Silencing RNA ou ARN interférence
dsRNA	Double-stranded RNA ou ARN double brin
RT-PCR	Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction ou ACP Amplification en chaine par réaction
RT-PCR _q	Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction quantitative
CS	<i>Canton Special</i> souche de référence

Résumé

Connaître la nature des empreintes mnésiques, comprendre les mécanismes présidant à la construction des souvenirs, leur stockage et leur rappel, en fait savoir comment nous apprenons et nous nous souvenons, cela reste une question majeure des recherches neurobiologiques. Mais il ne s'agit pas seulement de comprendre un mécanisme (celui de se souvenir) mais aussi, à la lumière de son fonctionnement, de développer des stratégies thérapeutiques destinées à compenser des dysfonctionnements mnésiques qui surviennent avec l'âge, ou lors d'atteintes neuropathologiques. La mémoire est supposée émerger d'un ensemble de modifications au sein des circuits ou réseaux neuronaux qui traitent l'information environnementale. Etant donné la complexité du phénomène et du cerveau, la compréhension des mécanismes sous-jacents à la mémorisation nécessite plusieurs approches.

Mon projet de recherche fut d'utiliser les progrès de la génétique et les capacités comportementales de la drosophile pour découvrir de nouveaux gènes impliqués dans des processus mnésiques à long terme. Grâce à un conditionnement olfactif de type pavlovien, associant odeur et chocs électriques, nous avons criblé une centaine de lignées transgéniques présentant une insertion d'un élément transposable dans un gène s'exprimant au niveau des corps pédonculés qui sont le centre anatomique de la mémoire olfactive. Ce crible a ainsi permis l'identification de deux nouvelles lignées mutantes pour la formation de la mémoire à long terme. Après avoir étudié les lignées P-Gal4, vérifié que l'anatomie des corps pédonculés ne présentait pas de défaut, nous avons identifié les gènes affectés, et construit des lignées exprimant des RNAi contre ces gènes. L'expression de ces RNAi uniquement à l'état adulte au niveau des corps pédonculés conduit à une chute spécifique de la mémoire à long terme. Les autres phases de mémoire sont normales.

L'un de ces gènes est totalement inconnu et nécessitera d'autres études pour déterminer sa fonction biochimique et son fonctionnement. L'autre gène est *debra*, qui semble être impliqué dans des phénomènes d'ubiquitination

INTRODUCTION

A. Historique du concept de mémoire

1. Définition et premières considérations

Dans le sens commun, la mémoire est l'aptitude à conserver et à restituer des choses passées. C'est une représentation sous une forme mentale, du dispositif permettant de stocker des informations. La mémoire désigne à la fois la capacité d'un individu ou d'un groupe humain de se souvenir de faits passés et ce souvenir lui-même. Mémoriser implique donc à la fois une capacité d'apprentissage, de stockage, et de restitution de l'information apprise. La mémoire a longtemps été considérée comme l'une des facultés principales de l'esprit humain, et réservée à l'homme.

a- Descartes ou les règles pour la direction de l'esprit

René Descartes s'intéressa aux moyens d'accéder à la connaissance dans son ouvrage "Les Règles pour la Direction de l'Esprit". Il s'agit d'une œuvre inachevée où il expose les règles qui selon lui permettent de diriger l'esprit. Elles sont au nombre de 21, et mentionnent à plusieurs reprises la mémoire. C'est avant tout une des ressources de l'intelligence humaine qui, au même titre que l'imagination, l'intuition et la déduction, se doit d'être travaillée pour accéder à la connaissance.

Exemple : règle douzième

*« Enfin il faut se servir de toutes les ressources de l'intelligence, de l'imagination, des sens, de la **mémoire**, pour avoir une intuition distincte des propositions simples, pour comparer convenablement ce qu'on cherche avec ce qu'on connoît, et pour trouver les choses qui doivent être ainsi comparées entre elles ; en un mot on ne doit négliger aucun des moyens dont l'homme est pourvu. »*

Pour Descartes, la mémoire est un moyen dont l'homme a à sa disposition pour mieux comprendre le monde qui l'entoure et dans lequel il vit.

Mais pour les philosophes qui s'intéressèrent par la suite à la notion et la nature de l'esprit, la mémoire n'était pas qu'un don du ciel.

« Il n'y a rien de plus immédiatement donné que la Conscience, Conscience qui signifie d'abord mémoire, c'est-à-dire synthèse temporelle, conservation du passé, et anticipation de l'avenir. » Bergson

b- Bergson ou le problème du corps et de l'esprit

À la fin du XIXe siècle, Bergson s'interrogeait sur la dualité du corps et de l'esprit et traite de la question de la mémoire. Bien que ce problème existe presque depuis l'origine de la philosophie (Platon, Aristote...), Bergson en a fait une question centrale, voir fondamentale de la philosophie de l'esprit. Dans son ouvrage « Matière et Mémoire » de 1896, il explore les fonctions du cerveau et entreprend une analyse de la perception et de la mémoire et propose des considérations sur les problèmes de la relation entre l'esprit et le corps. Pour Bergson l'analyse de la mémoire est un moyen de trancher ce problème entre processus mentaux et corporels. Il considère alors que la mémoire est profondément spirituelle, et que le cerveau ne se contente que d'orienter la mémoire vers l'action présente. Le cerveau insère des souvenirs dans le présent en vue de l'action. Le cerveau n'a alors qu'une fonction pratique tandis que le corps est le centre de l'action. Pour Bergson, les lésions du cerveau n'abîment pas le souvenir, ni la mémoire, mais perturbent la fonction pratique du cerveau. Les souvenirs ne peuvent dès lors plus être « incarnés » par l'action. Ils existent toujours, mais ils sont impuissants. En effet, le cerveau ne remplit plus sa fonction, on ne peut donc pas utiliser ces souvenirs.

Dans son ouvrage "Essai sur la relation du corps à l'esprit", Bergson analyse le problème classique de l'union de l'âme et du corps. Ce livre est écrit en réaction à "Maladies de la mémoire" de Théodule Ribot, paru en 1881. Ce dernier soutient que la science du cerveau prouve que le souvenir est logé dans une partie du système nerveux. Le souvenir serait localisé dans le cerveau, il serait donc matériel. Bergson s'oppose à cette réduction de l'esprit à la matière. Néanmoins en cette fin de XIXe siècle, les chercheurs Ribot et William James spécialisés en biochimie furent les premiers à tenter de déterminer en laboratoire de manière scientifique quels étaient les supports de la mémoire. Ils furent en cela très influencés par la théorie de la mémoire organique.

2. De la mémoire organique à l'étude organique de la mémoire¹

Les origines du concept de mémoire organique datent du XVIII^e siècle. Pour Maupertuis par exemple, les semences sont faites de particules provenant de tout le corps (théorie de la pangénèse), et possèdent entre elles certaines affinités. Ainsi le développement d'un fœtus est le résultat de l'attraction de certaines particules. Pour Maupertuis, ces molécules sont dotées de propriétés psychiques, conservant en elle le souvenir de leur situation. Elles savent en elles ce qu'elles doivent faire (Maupertuis, *Système de la Nature*, 1754).

Au XVIII^e siècle, en analogie avec les découvertes de Newton, il est considéré que les différentes modifications au sein d'un organisme sont le résultat de vibrations. Le cerveau étant un organe fibreux, ses modifications mémorielles sont donc représentées par des vibrations en son sein. Pour Ewald Hering, la mémoire est alors un principe fondamental de la nature, « fonction essentielle de la matière organisée » (Hering, 1870), commun à tous les êtres vivants. Hering rejoint de ce fait la théorie de la pangénèse, car pour lui la mémoire est incluse dans chacune des cellules et permet la transmission des caractères. Sa théorie est confortée par de nombreux confrères tel Edward Cope, adepte de la théorie de l'embryogénèse, qui expliquait l'évolution d'une espèce par le développement de l'embryon. On parle à l'époque de mémoire organique de l'hérédité ou comme pour Haeckel de « loi de la recapitulation ». Ainsi évolution et mémoire sont intimement liées. Le physiologiste Ewald Hering résume ce concept de mémoire organique en qualifiant la mémoire de « fonction universelle de la matière organisée ».

Ainsi mémoire et conscience sont reliées aux caractéristiques même des espèces. L'explication la plus poussée a été proposée par le biologiste allemand Ernst Haeckel dans son ouvrage "Les énigmes de l'univers". Haeckel résuma ainsi son concept en expliquant que « seuls les plastidules vivants, molécules individuelles du plasma actif, se reproduisent et

¹ Cette partie a été inspirée par les ouvrages de Schacter (Schacter, D. L. ; 2001 ; et Schacter, D. L., Eich, J. E., and Tulving, E. ; 1978) et des études de Jean-Claude Dupont. Le premier nommé y rend hommage aux pionniers de la science de la mémoire, et replace les différents concepts établis dans leur contexte historique. Le second est l'auteur d'une analyse historique et épistémologique des neurosciences. (J.-C. Dupont (2003) "Modèles biologiques de la mémoire: éléments d'épistémologie et d'histoire". Dans "Nouveaux débats sur le vivant", M-C Maurel, P-A Miquel (eds), Paris: Kimé).

possèdent ainsi la mémoire ». La mémoire est alors intrinsèquement organique. Elle se présente sous la forme d'entités microscopiques, composantes de toutes les fibres et en particulier des fibres nerveuses au sein du cerveau. Grâce à cette situation ubiquitaire, la mémoire contrôle le devenir et le développement des individus.

Ces premières considérations sur la mémoire font alors office de dogme. Il s'agit d'une notion trop importante et métaphysique pour l'aborder uniquement par le versant scientifique. Et même si des théories subtiles et proches de ce que nous connaissons aujourd'hui se développent, elles ne s'affranchissent pas du poids du concept de mémoire organique. C'est Richard Semon, naturaliste allemand qui est le premier à développer une psychologie de la mémoire en évoquant les trois étapes clefs des phénomènes de mémorisation : apprentissage, stockage, et restitution. Sa théorie repose sur le « Mneme » qu'il définit comme étant la propriété organique fondamentale qui permet aux effets des expériences de persister dans le temps. Il développe son concept en évoquant l'engramme pour définir un langage codant les nouvelles informations relatives à l'apprentissage, l'engramme pour définir la trace mnésique, et l'écphorie pour parler de leur restitution. Mais pour Semon, le Mneme est le processus biologique à la base de la mémoire et de l'hérédité. Hérédité et mémoire biologique ne font qu'un, car ils sont constitués des mêmes plastidules. «Le Mneme est la plasticité organique fondamentale qui permet aux effets de l'expérience d'être préservés dans le temps non seulement durant la vie de l'individu mais aussi à travers les générations.»

3. Un ensemble de « connexions ». Les voies nerveuses de Théodule Ribot et Donald Hebb

Pour Théodule Ribot, la « mémoire organique », à la différence de celle de Hering, est surtout une fonction biologique du système nerveux. Il considère qu'il s'agit de « modifications particulières imprimées aux éléments nerveux » et que cela nécessite « une association, une connexion particulière établie entre un certain nombre de ces éléments. » (Ribot T., 1881). Ribot propose un modèle de réseau dynamique qui se rapproche de celui de Donald Hebb.

Pour Hebb, les traces mémorielles correspondent à des circuits dont les connexions (synapses) s'ouvrent et se ferment en fonction de l'expérience (Hebb, 1949). L'apprentissage

résulte de la modification des synapses, et du rappel du passage de l'influx dans les voies particulières concernées. Les théories de Hebb semblent confirmer l'intuition de Richard Semon: les changements plus ou moins définitifs permettant d'emmagasiner les souvenirs ne concernent pas les cellules nerveuses unitaires. C'est la multiplicité des contacts entre ces cellules qui constituent la banque de donnée.

4. Naissance de la biologie de la mémoire

a. Les premières oppositions à la mémoire organique

La première critique adressée à Semon souligne que son hypothèse de l'hérédité comme mémoire reste une simple analogie et n'éclaire pas véritablement la nature des processus. Weissman fait partie des leaders de cette discipline naissante qu'est à cette époque la génétique. Celle-ci s'oppose très vivement au concept de la mémoire organique en lui reprochant de vouloir unifier des processus différents. La génétique tente de localiser matériellement les molécules responsables de l'hérédité qui n'est pas un souvenir. Les engrammes ne sont pas des gènes.

La critique principale faite à Haeckel et à ses disciples est qu'ils aient tenté d'unifier des processus disparates, et placer la biologie au-delà de l'expérimental. Le concept de mémoire organique va alors peu à peu s'effacer au fur et à mesure des expériences et des découvertes.

b. Premières considérations scientifiques sur la mémoire

Les premières expériences scientifiques sur la mémoire qui lui donnèrent un support moléculaire réel furent menées dans les années 60 par les biologistes et psychologues américains James V. McConnell et Thompson. Au début des années soixante, James V. McConnell, étudiant en psychologie, commence à dresser des planaires turbellariés ou plathelminthes. Il s'agit de vers plats sans tête, ni appendice distincts. Il fit apprendre à ses vers à éviter une source lumineuse en l'associant préalablement à un choc électrique, le test consistant à placer ces vers dans un petit appareil avec un côté lumineux et un côté sombre

(Thompson, R. and McConnell C.J.; 1955). Une des propriétés de ces vers est que lorsqu'on les coupe en deux, encore vivant, chacune de ses moitiés se régénère en deux vers complets – une nouvelle tête apparaît chez la moitié queue, et une nouvelle queue apparaît chez la moitié tête. McConnell découvrit alors que lorsqu'un vers a été conditionné à éviter la lumière, si l'on coupe ce vers en deux et qu'on laisse le temps à chacune de ses moitiés de se régénérer, les deux demi-vers présentent une évidente appréhension pour le côté lumineux, ce que McConnell interpréta comme une évidence pour démontrer que, chez le ver, la mémoire ne se localisait pas dans le cerveau. En 1961, il démontra que la moitié-queue pouvait perdre ses informations si elle était mise en présence de RNase. Étant donné la période d'émulations et d'excitations scientifiques de l'époque, – la structure et le rôle dans l'hérédité de l'ADN venaient d'être découverts par Watson, Crick, Wilkins et Franklin en 1953 – nombre de chercheurs se mirent à étudier la fonction de l'ADN ou de l'ARN sur ce que McConnell avait supposé être la « molécule diffuse codant l'information mnésique ». En 1962 McConnell fit une expérience encore plus impressionnante. Il conditionna dans un premier temps des vers qu'il broya et servit comme nourriture à d'autres vers. Il observa alors que ces vers apprenaient beaucoup plus rapidement à éviter l'association lumière-choc électrique, que des vers contrôles, nourris aux vers non entraînés. La logique était que puisque l'ARN code une information et que toutes les cellules vivantes produisent et modifient les molécules d'ARN en réaction aux événements extérieurs, l'ARN était le support de l'information mnésique (McConnell, J. V., 1962). L'ensemble de ces expériences permit à McConnell de poser les bases de son concept de mémoire à ARN (Block, R. A. and J. V. McConnell, 1967). Malheureusement aucun de ses collègues ne put répéter ses expériences. Pire, un biais expérimental fut mis en évidence dans ces expériences. Ces vers laissaient une trace olfactive dans la boîte à test, ce qui incitait les vers suivants à prendre la même direction.

Ainsi la recherche et l'identification de molécule mémoire, basées sur des expériences de transfert, apparurent illusoire, et ces expériences biaisées furent mises sur le compte d'un réductionnisme excessif dû à l'engouement nouveau pour la biologie moléculaire.

C'est à partir de cette période qu'une nouvelle conception de l'approche de l'étude de la mémoire est adoptée. En effet on considérait alors que la mémoire était organique et qu'il fallait chercher son support – unique et multiple à la fois, car il devait représenter chaque souvenir différemment. Mais dès lors de nouvelles considérations se développèrent. Il fallait mener une approche biologique et organique de la mémoire et la considérer comme une entité beaucoup moins tangible que ce que la biologie moléculaire avait fait espérer dans un premier

temps.

Les échecs répétés de ces tentatives conduisirent à une nouvelle période de recherche, qui ne s'intéressant plus aux « Mneme », se focalisa dès lors aux corrélats chimiques des processus de mémorisation au sein du cerveau. Le concept de mémoire organique sera alors progressivement abandonné, car une biologie de la mémoire nécessite l'abandon complet des analogies précédemment effectuées par les penseurs des décennies ultérieures.

5. Les réseaux neuronaux et la plasticité

Donald Hebb est un neurophysiologiste canadien. Il fut à ses débuts très influencé par les travaux de Wolfgang Köhler et les découvertes sur la résolution de problèmes chez les chimpanzés, et de la notion de « insight ». Dans son livre, "The Organization of Behavior", il défend une conception biologique de la psychologie et affirme qu'elle n'est ni plus ni moins que l'étude du système nerveux. Il y expose ses idées sur l'apprentissage et l'association entre les neurones. L'idée principale est que lorsqu'un neurone envoie des messages bioélectriques répétés à un autre neurone, le deuxième neurone devient graduellement plus sensible aux messages du premier.

« When an axon of cell A is near enough to excite B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased »

Ce qui est souvent paraphrasé par : « *Neurons that fire together wire together* »

"Si 2 cellules sont activées en même temps, alors la force de la connexion augmente."

Cette règle essentielle pour les recherches sur l'apprentissage associatif et la mémoire signifie que lorsque deux neurones interconnectés déchargent ensemble, ils ont tendance à s'associer, et à renforcer leurs interconnexions.

Ainsi l'idée d'un réseau neuronal plastique prend forme au sein de la communauté

scientifique, et les années 60-70 virent apparaître énormément de tentatives de mise en évidence de cette plasticité synaptique. On essaya dans un premier temps de comparer les cerveaux d'animaux ayant appris quelque chose à ceux d'animaux de contrôle. Mais les limites conceptuelles et surtout expérimentales ne permirent pas à ces travaux d'aboutir.

Dès lors plusieurs approches ont été proposées pour éviter une partie de ces obstacles. Les techniques d'empreinte ou d'imprégnation chez les poussins (attachement très profond d'un animal à un parent, un congénère ou à un objet, comportement décrit par Konrad Lorenz en 1970), de sensibilisation ou d'habituation chez l'aplysie ou le chat, ou d'apprentissage simple entre l'association de deux stimulus chez la drosophile... Grâce à ces nouveaux modèles expérimentaux d'importantes découvertes ont été effectuées.

Il a été mis en évidence que chez pratiquement tous les organismes, des applications répétées du même stimulus provoquent une décroissance progressive de la réponse. La réponse peut aussi s'accroître si les stimuli apparemment neutres peuvent s'accompagner d'autres stimuli plus nocifs² ou en fonction de l'intensité des stimuli et de leur espacement. Les études menées par ces chercheurs sur la moelle des vertébrés ont démontré la capacité des neurones à modifier leur fonction d'excitabilité (à augmenter ou à diminuer leur sensibilité à des stimuli particuliers) c'est-à-dire à distinguer et retenir différents stimuli. Dès lors il fallait relier ces modifications fonctionnelles, comportementales, à des modifications morphologiques ou biochimiques. Horn et ses collaborateurs ont découvert que les empreintes mnésiques se caractérisaient par d'importantes augmentations de synthèse d'ARN, et ce dans certaines régions spécifiques. Ces résultats seront confirmés par ceux de Hyden qui démontra que des augmentations d'ARN caractérisent certains types de mémoire (Hyden et al., 1962). Ainsi mémoire et synthèse d'acide ribonucléique vont de pair, et la synthèse protéique est le reflet des modifications de structure des neurones.

Mais dès lors de nouvelles questions se posent. Comment sont générées les nouvelles synapses? Quelles seraient les bases moléculaires de cette plasticité? C'est la théorie chimique de la neurotransmission qui se trouve alors en mesure de fournir des modèles de plasticité neuronale.

² Expérience sur l'aplysie où si le siphon par lequel elle expulse l'eau est effleuré par un stimulus, il y a rétraction de la branchie. Si le stimulus est répété plusieurs fois de façon régulière, l'aplysie s'habitue: elle ignore le stimulus et ne retire plus sa branchie. Si l'animal subit une expérience désagréable, comme une petite décharge électrique sur la queue, l'habitude disparaîtra brusquement et l'animal réagira de façon excessive à un stimulus qui effleure le siphon. Cette sensibilisation qui dure quelques minutes ou quelques heures et peut être considérée comme une forme simple de mémoire à court terme.

Les bases de cette neuroplasticité et les modalités particulières de la neurotransmission liées à la mémoire et à l'apprentissage ont été précisées par le prix Nobel Erik Kandel dès 1976. Il démontra que les modifications du comportement dépendent d'altérations "plastiques" dans les synapses du circuit nerveux. Kandel a pu alors reconstituer la topographie des voies neuronales intervenant dans ces processus d'habituation et de sensibilisation chez cette espèce (Squire L.S., Kandel E.R. 1999). Il démontra ensuite progressivement les rôles de molécules telles que la sérotonine, et des adényl cyclases productrices d'AMPc et des récepteurs glutamatergiques, mais également des chaînes métaboliques de régulation des ions Ca^{2+} .

L'idée de mémoire a ainsi largement évolué au cours des siècles. D'un concept purement philosophique, la mémoire est devenue au fil de nouvelles théories naissantes, une composante vibratoire de chacune de nos cellules, le chaînon expliquant l'évolution des espèces, une molécule d'ARN transmissible, pour finalement être un ensemble de réactions chimiques, et de réseaux neuronaux au sein du cerveau.

6 Le « comportementisme » : l'apport d'Ivan Pavlov et du conditionnement

L'étude de la mémoire et dans un premier temps de l'apprentissage nécessite avant tout une base théorique et expérimentale. Le processus d'acquisition d'une l'information nouvelle résulte généralement d'un effet d'entraînement ainsi que d'un effet de renforcement. L'apprentissage consiste à acquérir ou à modifier une représentation d'un environnement de façon à permettre avec celui-ci des interactions efficaces ou de plus en plus efficaces. Pour la psychologie inspirée du comportementisme, l'apprentissage est vu comme la mise en relation entre un événement provoqué par l'extérieur (stimulus) et une réaction adéquate du sujet, qui cause un changement de comportement qui est persistant, mesurable, et spécifique. C'est ce dernier point qui est le plus important, en particulier dans les travaux de recherche que j'ai effectué car c'est la modification du comportement que nous étudions et mesurons.

Le conditionnement est un mécanisme d'apprentissage qui est au centre des théories behavioristes. On distingue généralement les conditionnements « classique » de type pavlovien et « opérant » tel celui mis en place 20 ans après les expériences de Pavlov par le psychologue Skinner quand il apprenait à des rats à appuyer sur un levier pour accéder à leur nourriture.

Le conditionnement classique a été théorisé par Ivan Pavlov à la fin du 19^{ème} siècle. Etudiant initialement le système gastrique des canidés et leurs sécrétions salivaires, il remarque que les chiens avaient tendance à saliver avant d'entrer réellement en contact avec les aliments. Il décida alors d'étudier cette « sécrétion psychique » en variant les stimuli précédant la présentation de la nourriture. Ces travaux lui permirent de découvrir les lois fondamentales de l'acquisition et la perte de ce qu'il appela les « réflexes conditionnels », c'est-à-dire les réponses réflexes qui ne se produisaient que de façon conditionnelle dans des conditions expérimentales.

Ces réflexes peuvent s'apparenter à une réaction involontaire, non innée, provoquée par un stimulus extérieur. Pavlov a développé la théorie selon laquelle les réactions acquises par apprentissage deviennent des réflexes lorsque le cerveau fait les liens entre le stimulus et l'action qui suit. D'après Pavlov, il y a deux types de réflexes, les réflexes innés, déjà présents à la naissance, et les réflexes conditionnels, ceux que l'on acquiert avec l'apprentissage. C'est sur cela qu'il se base pour faire avancer sa théorie et donner corps à cette idée.

L'idée de « conditionnement » en tant que forme automatique d'apprentissage est devenue un concept clé dans la psychologie comparative qui se développait et l'approche générale de la psychologie qui la sous-tendait : le béhaviorisme. La théorie béhavioriste fait du comportement observable l'objet même de la psychologie. La plupart des théories de l'apprentissage reconnaissent trois grandes variables dans le processus : l'environnement qui stimule ou le stimulus S, l'organisme qui est stimulé soit l'individu I, et le comportement ou la réponse de l'organisme par suite de la stimulation R. Le schéma classique est donc :

$$S \Rightarrow I \Rightarrow R$$

Dans le cas des travaux de Pavlov ce schéma est simplifié en

$$S \Rightarrow R$$

La notion de réaction non volontaire est le principal point de différence avec le conditionnement opérant développé par Skinner au milieu du 20^{ème} siècle. Ce dernier type de conditionnement présume un être actif avec son environnement, ce qui n'est pas le cas dans les expériences de Pavlov, ni dans nos expériences avec les drosophiles explicitées plus loin dans le manuscrit.

Le mécanisme de conditionnement développé par Pavlov offre non seulement un outil d'analyse des interactions entre un organisme et son milieu, mais aussi un moyen de pénétrer la dynamique cognitive des sujets d'études. Ses travaux ont ouvert la voie à de nombreux courants scientifiques telles que la physiologie cérébrale, la psychologie, sans oublier les neurosciences. Les travaux sur les reflexes conditionnels ont également eu une grande influence sur la culture populaire. L'expression "chien de Pavlov" est souvent utilisée pour décrire des individus privilégiant des réactions instinctives plutôt que l'utilisation de l'esprit critique. Dans « Le Meilleur des mondes » d'Aldous Huxley, le conditionnement pavlovien est un thème central du roman. Le conditionnement dirige les goûts futurs des membres de la société. La caste des *epsilons* apprend par exemple à ne pas aimer les fleurs, goût n'engendrant pas une activité économique intéressante. Ainsi, nous ne saurions surestimer l'importance des résultats considérables des travaux réalisés par celui qui deviendra le premier prix Nobel russe. Ses expériences de comportement sont à la base de nombreux travaux de recherche dans le monde, et en particulier dans le cadre des recherches que j'ai effectuées au sein de ce laboratoire.

« Si nous voulons savoir ce qu'est l'homme, nous devons savoir d'abord ce qu'est l'animal. »
Sextus Empiricus (M, VIII, 87)

B. Intérêt de la drosophile

La drosophile est l'un des organismes les plus étudiés en laboratoire par les biologistes. C'est un organisme modèle de premier choix dans de nombreux axes de recherche. La drosophile est un champ d'investigation nécessaire pour des recherches allant du développement, à l'étude des différents mécanismes cellulaires ou encore des phénomènes comportementaux communs à de nombreuses espèces. Ceci est particulièrement vrai pour l'étude du système nerveux. En effet, le cerveau de la drosophile est composé de neurones et de cellules gliales, comme ceux de la plupart des autres organismes. Les neurotransmetteurs permettant les diverses communications entre cellules sont conservés dans toutes les espèces. De plus, en dépit d'un nombre limité de cellules au sein de son système nerveux, la drosophile est néanmoins capable de produire des comportements complexes, mettant en jeu des capacités d'apprentissage et de mémorisation variées.

Au-delà d'études fondamentales sur le fonctionnement du cerveau, la drosophile se révèle surtout comme un modèle de premier ordre pour l'étude de maladie neurodégénérative. Le développement de techniques de biologie moléculaire variées, permettant un contrôle spatio-temporel quasi absolu de l'expression de gène ciblé, permet de disséquer les mécanismes d'action et les voies métaboliques altérées par les dégénérescences. Ces approches sont possibles car 50% des gènes humains ont un orthologue chez la drosophile (Rubin, Yandell et al., 2000). Enfin plusieurs études de maladie humaines ont été effectuées chez la drosophile, grâce à des approches transgéniques, en insérant dans le génome de la drosophile des gènes humains mutés ou non. Ainsi la liste des maladies touchant l'espèce humaine étudiée chez la mouche s'agrandit chaque année et inclut désormais également les maladies de Parkinson, Alzheimer, Huntington, et beaucoup d'autres (revue Bier 2005).

I Conservation des gènes homme/drosophile

De nombreux groupes ont comparé les liens évolutifs entre vertébrés et invertébrés. L'idée qui date de Darwin et qui considère que tous les êtres vivants descendent d'un ancêtre commun, LUCA (Last Universal Common Ancestor), laisse à penser que les grandes fonctions biologiques sont partagées par tous les organismes. En effet la plupart des voies de signalisation qui permettent leur développement, les principes de communication entre cellules ou neurones (sans oublier l'essence même de la vie l'ADN et l'ARN) sont partagés par tous les êtres vivants malgré les millions d'années d'évolution qui nous séparent de l'ancêtre commun. Or si une telle conservation existe dans les grands fonctionnements, c'est parce qu'il existe une très grande conservation des gènes au cours de l'évolution. Mais pour pouvoir réellement comparer les génomes, il faut avant tout les avoir séquencés.

2001 fut une année à marquer d'une pierre blanche, pour la recherche et la médecine en général, mais surtout pour les études génétiques. En effet c'est au cours de cette année que la compagnie Celera de Craig Venter acheva le séquençage du génome humain (Venter, Adams et al., 2001). Même si de nombreuses polémiques éclatèrent entre différents consortiums concernant la reconstruction du génome humain, qui à l'époque n'était qu'une ébauche, c'est-à-dire des séquences brutes non agencées, la séquence complète a été terminée en 2004 par un consortium international public. Néanmoins l'objectif initial n'était pas de séquencer les quelques 3 milliards de paires de base, mais plutôt d'identifier les gènes, ainsi que les protéines codées et leurs fonctions. Mais savoir où se situe un gène, connaître l'identité de la protéine, son patron d'expression, ne sont pas des données suffisantes pour identifier sa fonction et encore moins pour définir son rôle dans différents mécanismes moléculaires et cellulaires. Il est alors indispensable de passer par un organisme modèle pour l'étudier. Le génome de la levure a été séquencé en 1996, celui du ver *Caenorhabditis elegans* en 1998 (1998; Bargmann 1998), celui de la drosophile en 2000 (Adams, Celniker et al., 2000), et celui de la souris en 2002 (Marshall 2002). Le génome humain présente 80 % de similitude avec celui de la souris et 60 % avec celui de la drosophile.

De nombreuses équipes ont alors essayé de comparer plus précisément les gènes impliqués dans des maladies humaines avec les génomes d'autres espèces. En fonction des techniques d'analyse et selon divers critères, celles-ci sont arrivées à différents résultats. L'équipe du Dr Ethan Bier à l'University of California San Diego a analysé 714 protéines

humaines impliquées dans diverses maladies et regroupées dans la banque de donnée OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) qu'il a comparées au génome de drosophile (Reiter, Potocki et al., 2001; Chien, Reiter et al., 2002). En tenant compte de critères précis (BLASTP, E value of 10^{-10}), il a montré que sur les 714 protéines analysées, 548 d'entre elles ont un homologue chez la drosophile, soit 76%. L'équipe du Pr. Fortini à l'University of Pennsylvania School of Medicine a analysé 287 autres gènes présents dans l'OMIM, et montré que 62% d'entre eux ont un homologue chez la drosophile également (Rubin, Yandell et al., 2000).

Il est alors possible d'étudier l'homologue d'un gène humain impliqué dans une pathologie chez la drosophile. Cela permet de mettre en place des stratégies invasives qui ne pourraient, pour des questions pratiques et éthiques, être appliquées à l'homme.

II La puissance de la drosophile comme animal modèle

La drosophile est un cobaye exceptionnel en génétique et ce pour de nombreuses raisons. Elle est très facile à élever en laboratoire, et du fait de sa petite taille, des centaines de lignées différentes peuvent être stockées dans des étuves. De plus, comme il s'agit d'animaux à sang froid, son cycle de génération dépend de la température. A 18°C il faut compter 3 semaines pour obtenir la génération suivante, et seulement une douzaine de jours à 25°C. Comme la génétique s'intéresse à la transmission des caractères, il s'agit là d'un avantage indéniable par rapport aux mammifères comme la souris ou le rat. Les femelles peuvent pondre jusqu'à 500 oeufs en 10 jours, ce qui permet d'avoir largement assez d'individus et donc de matériel pour pouvoir travailler. Les larves de troisième stade ont dans leurs glandes salivaires des chromosomes polythènes géants qui permettent des analyses aisées de localisation chromosomique de protéine. Leur génome compact ne possède que 3 autosomes, et un chromosome sexuel. Les mâles n'effectuant pas de recombinaison, les études génétiques en sont alors grandement facilitées. Les « outcross » s'effectuent alors uniquement chez les femelles. Enfin, et c'est le point le plus important, les techniques de transformation génétique associées au développement de la biologie moléculaire permettent aux scientifiques de manipuler quasiment à leur guise le génome de la drosophile. Il est possible de perturber l'expression d'un gène, soit par l'insertion de mutation ponctuelle avec des agents mutagènes

tel que l'EMS, soit par l'insertion contrôlée ou aléatoire d'éléments transposables. C'est ce que l'on appelle la transgénèse. Néanmoins, l'outil le plus utilisé actuellement pour inhiber l'expression d'un gène est l'utilisation d'ARN interférence ou siRNA. Il s'agit d'un fragment d'ARN double brin qui a la capacité de se replier sur lui-même et qui interfère avec un ARN messager spécifique endogène conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. En 2006, plus de 14000 articles scientifiques faisaient référence à cette technique d'interférence ARN, montrant l'extraordinaire intérêt que les chercheurs lui portent. L'utilisation de siRNA pour étudier la fonction d'un gène est devenue en très peu d'années une technique de base, utilisée par des biologistes de toutes disciplines. Mais il est également possible de sur-exprimer des gènes grâce à des vecteurs de sur-expression. Il est même aujourd'hui possible grâce à des promoteurs inductibles de contrôler de manière spatiotemporelle l'expression de ces transgènes.

Sur la page suivante est présentée une liste non exhaustive des outils moléculaires couramment utilisés en génétique chez la drosophile : liste 1.

liste 1: liste non exhaustive des outils utilisés en génétique chez la drosophile.

Tool	Description
Expression control	
GAL4	Yeast transcription factor used to drive expression of transgenes downstream of the GAL4 upstream activating sequence (UAS _{GAL4})
UAS _{GAL4}	Promoter driven by GAL4; any gene cloned downstream can be driven in a cell-specific manner when combined with a region-restricted GAL4
GAL80	Yeast repressor of GAL4, can be used to spatially limit GAL4 activity
GAL80ts	A temperature sensitive GAL80 used in the TARGET system to provide user-determined temporal control of spatially restricted GAL4 activity
GeneSwitch	A steroid-hormone activated GAL4, allowing user-determined temporal control of spatially restricted GAL4 activity
OR{GAL4}	Olfactory receptor gene promoter-driven GAL4
TH{GAL4}	Tyrosine hydroxylase gene promoter-driven GAL4, to control transgene expression in dopaminergic neurons
TDC2{GAL4}	Tyrosine decarboxylase 2 gene-promoter driven GAL4, to control transgene expression in octopaminergic (and tyraminerbic) neurons
MB{GAL4}	There are many {GAL4} enhancer-trap lines that permit transgene expression in subsets of MB neurons
DPM{GAL4}	Several {GAL4} enhancer-trap lines that permit transgene expression in DPM neurons
FLP-FRT	A site-specific recombination system that can be used to limit the expression of reporter genes so that single neurons can be labelled
MARCM	Mosaic analysis with a repressible cell marker, a sophisticated genetic trick using GAL80 that allows single (wild-type or mutant) neurons to be labelled
LexA/LexAop	Binary transcription factor system based on the bacterial LexA transcription factor. LexA transactivates promoters containing the LexAop sequence. This system is independent of GAL4 but variants have been engineered that can be repressed by GAL80. Dual use of LexA/LexAop and GAL4/ UAS allows one to simultaneously manipulate different neurons
Reporters	
UAS-Cameleon 2.1	A ratiometric fluorescent reporter of intracellular Ca ²⁺
UAS-SpH	Synaptophluorin, a pH-sensitive fluorescent reporter of synaptic transmission
UAS-GCaMP	A high signal-to-noise fluorescent reporter of intracellular Ca ²⁺
Effectors	
UAS-TNT	Tetanus toxin light chain; blocks neurotransmitter release
UAS-shibire ^{ts1}	A temperature-sensitive blocker of synaptic transmission resulting from a block of endocytosis and therefore synaptic vesicle recycling
UAS-P2X2	A rat ionotropic ATP receptor that permits direct stimulation of genetically marked neurons following photoactivation of caged ATP
UAS-VR1	A rat vanilloid receptor that permits direct stimulation of genetically marked sensory receptors with capsaicin
UAS-ChR2	Channelrhodopsin 2, an algal blue-light-activated cation channel that permits direct stimulation of genetically marked neurons with light
UAS-PTX	Pertussis toxin; inhibitor of G _o signalling
UAS-PAC α	Photoactivated adenylyl cyclase, a flagellate adenylyl cyclase that permits stimulation of cAMP synthesis in genetically marked neurons with blue light

from Alex C. Keene and Scott Waddell 2007

III Les limites de la drosophile

Néanmoins l'utilisation de la drosophile pose quelques difficultés. Il est en effet peu évident de développer des stratégies reposant sur de l'électrophysiologie et ainsi d'étudier les neurones *in vivo*, contrairement à ce qu'il est possible de faire chez des mammifères ou bien encore chez l'aplysie (qui dispose des plus gros neurones de tout le règne animal). Il existe également des modèles animaux dotés de temps de génération plus court, de génome plus petit, et se reproduisant tout autant et qui peuvent être rapidement criblés génétiquement. C'est le cas du nématode ou de la levure. De plus pour l'étude du système nerveux, qui a pour but d'aider à la compréhension du cerveau humain, étant donné la complexité de ce dernier avec ses milliards de neurones et certainement mille fois plus de synapses, l'identification des mécanismes biologiques qui sous-tendent l'activité d'un système passe obligatoirement par l'étude de système beaucoup plus simple et facilement manipulable. *C. Elegans* possède un système nerveux simple composé de 302 neurones identifiés, et formant 7000 synapses dont 2000 jonctions neuromusculaires et 600 jonctions communicantes (*gap junctions*) (Sengupta, et al., 1993). A titre de comparaison, une seule cellule pyramidale du cortex de mammifère forme plus de 10000 synapses (1998; Bargmann 1998). *C. elegans* est transparent durant la totalité de son développement. Chaque neurone peut être identifié individuellement en microscopie optique d'après la position de son noyau dans l'animal. Avec un laser, il est ensuite possible de procéder à la photo-ablation d'un neurone ou d'un groupe de neurones pour évaluer leur fonction dans un comportement précis (Bargmann 1998). De profondes altérations du système nerveux ne sont généralement pas incompatibles avec le développement de *C. elegans* en conditions de laboratoire. Ainsi, sur les 302 neurones présents chez *C. elegans*, seuls 3 sont absolument nécessaires à la survie de l'individu en condition de laboratoire: le neurone M4 qui permet la relaxation du pharynx, et la paire de neurones CANL et CANR qui contrôlent l'osmolarité du milieu intérieur. De ce fait, des mutations affectant profondément le développement ou le fonctionnement du système nerveux de *C. elegans* sont viables et analysables chez l'adulte.

Ainsi, la drosophile n'apparaît pas forcément comme le modèle ultime pour l'étude du système nerveux. Il faudrait pouvoir à la fois combiner l'approche électrophysiologique possible chez les mammifères, avec la simplicité du système nerveux du ver. Mais quid du

comportement ? Malgré quelques inconvénients par rapport à d'autres modèles biologiques, la drosophile semble être à la croisée des chemins grâce à son large éventail de comportements.

IV Les différents comportements

Il a été montré que la mouche drosophile est capable de comportements complexes qui impliquent l'existence d'une mémoire solide. Son comportement naturel dépend entre autre de son expérience personnelle, il est possible de lui apprendre à réagir à certains stimuli, de la même façon que le chien conditionné de Pavlov salive quand sonne l'heure du repas. Plusieurs comportements ont été étudiés pour poser les bases d'un modèle d'apprentissage et de mémorisation.

a- La parade

Un des comportements mettant en jeu la mémoire chez la mouche est la parade nuptiale (Spieth 1974; Sciandra and Bennett 1976). Le mâle prétendant marque son intérêt pour la femelle par une succession d'attitudes stéréotypées (chant vibratoire, danse, attouchement sexuel) facilement observables. Or la femelle drosophile ne s'accouple qu'une fois par semaine environ car il se constitue en son sein un stock de spermatozoïdes qui lui permet de pondre 20 œufs quotidiennement sans nouvel accouplement. Un mâle sans expérience a tendance à tenter sa chance chaque fois qu'il est en présence d'une femelle. Une femelle fraîchement fécondée, quant à elle, rejette énergiquement tout nouveau prétendant. Le mâle éconduit associe alors les phéromones de la femelle à son attitude de rejet (apprentissage associatif). Fort de cette expérience, le jeune mâle réduit alors notablement son attitude de courtisan par rapport à un mâle « naïf ». Le comportement du mâle est ainsi modifié par l'expérience : il y a eu apprentissage. Si cette observation met en évidence les capacités d'apprentissage de la mouche, et si elle a permis d'affiner la description de la mémoire, elle ne permet pas une mesure facile des capacités mnésiques. En effet, le phénomène met en jeu des paramètres difficilement contrôlables qui entraînent une variabilité importante des comportements observés (production de phéromones en quantité variable selon les individus, etc.).

b- Ajustement du vol de la drosophile en fonction des stimuli visuels perçus

Pour disposer d'outils permettant une mesure plus précise de la mémoire visuelle, des protocoles d'apprentissage associatifs plus standardisés ont été mis au point. L'un des plus spectaculaires est le « simulateur de vol », développé par le laboratoire de M. Heisenberg à Würzburg, en Allemagne (Wolf and Heisenberg 1990). L'appareil est constitué d'une arène mobile au centre de laquelle une mouche est suspendue par le cou à une tige métallique reliée à un capteur qui mesure les torsions imprimées par les mouvements de la mouche (figure 1). Ces torsions représentent la direction virtuelle du vol, elles sont interprétées par un ordinateur qui en réponse va modifier le panorama présenté à la mouche. Par exemple lorsque la mouche oriente son vol vers la gauche l'arène panoramique opère une rotation vers la droite, lui donnant ainsi l'impression qu'elle est effectivement en train de tourner. La mouche peut choisir de voler face à deux formes géométriques, un T et un T inversé, qui constituent des stimuli neutres. Pendant le conditionnement, une lumière chauffe son abdomen quand elle « vole » vers le T. La mouche associe la sensation de brûlure à la perception visuelle du T. Cet apprentissage associatif est qualifié d'opérant car la mouche est libre d'échapper au stimulus négatif à tout moment. Elle apprend en réponse à son exploration active de l'environnement. À la suite de la phase de conditionnement le test de mémoire commence : la direction du vol de la mouche est enregistrée en absence de lumière chaude. Si elle a bien appris, la mouche évite le T précédemment associé à la chaleur et s'oriente préférentiellement face au T inversé. La proportion du temps passé par la mouche en direction du T inversé est une mesure de sa mémoire visuelle. Au bout de 24 heures, la mouche vole indifféremment en direction des deux formes géométriques. L'information T = chaleur a été stockée, mémorisée pour ensuite être progressivement oubliée en absence de nouveau renforcement.

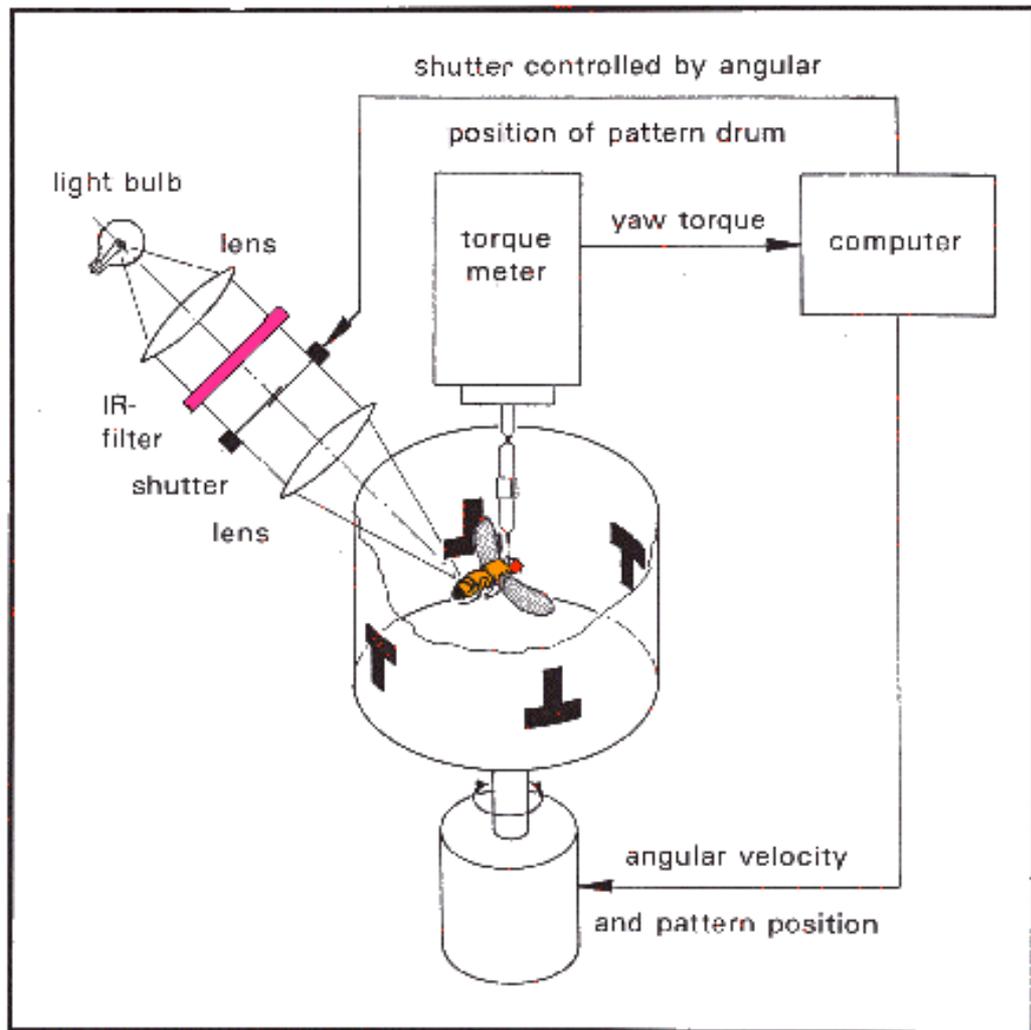


Figure 1: Schéma du « simulateur de vol »

Cet appareil est constitué d'une arène mobile au centre de laquelle une mouche est suspendue par le cou à une tige métallique reliée à un senseur qui mesure les torsions imprimées par les mouvements de son corps. Ces torsions représentent la direction virtuelle du vol, elles sont interprétées par un ordinateur qui va modifier le panorama présenté à la mouche. La lumière chauffe son abdomen lorsqu'elle se dirige vers le T, ce qui constitue un conditionnement négatif. Elle est libre d'échapper au stimulus négatif à tout moment en se dirigeant dans une autre direction. Le test de mémoire s'effectue à 24 h : la direction du vol de la mouche est enregistrée en absence de lumière chaude. La proportion du temps passé par la mouche en direction du T inversé est une mesure de sa mémoire visuelle ; (Selon Wolf et Heisenberg, 1990)

c- La mémoire olfactive

Si la mouche présente une mémoire visuelle, le paradigme le plus robuste reste le protocole d'apprentissage associatif mettant en jeu l'olfaction. En effet, la drosophile possède un odorat extrêmement sensible capable de détecter jusqu'à la femtomole. Ce protocole permet une analyse statistique de la mémoire puisqu'il fait intervenir une population de mouches. On obtient une valeur moyennée, plus fiable mathématiquement. Mis au point aux Etats-Unis au milieu des années 70 par Seymour Benzer (Quinn, Harris et al., 1974), puis amélioré par Tim Tully et William Quinn (Tully and Quinn 1985), le conditionnement olfactif de la drosophile repose sur la présentation simultanée d'une odeur et d'un choc électrique, à la suite de quoi les mouches ont tendance à éviter cette odeur même en l'absence du choc.

Ce type de conditionnement est de type classique ou non opérant. Dans ce cas, le stimulus à conditionner est un événement extérieur tandis que dans le cadre d'un conditionnement non-opérant ou appelé apprentissage skinnerien ou de type II, il s'agit d'une action de l'animal lui-même, qui génère l'apprentissage.

Pratiquement, un groupe de mouches est emprisonné dans un tube recouvert à l'intérieur d'une grille électrifiable, parcouru par un courant d'air chargé d'odeur. Les mouches sont soumises à une première odeur en même temps qu'à des chocs électriques. Ensuite une seconde odeur leur est présentée sans choc électrique. Elles sont finalement transportées à un point de choix où elles peuvent se déplacer librement dans deux compartiments contenant chacun une des deux odeurs utilisées pour le conditionnement, mais cette fois en l'absence de choc. À la fin de la phase de test, les mouches contenues dans chaque compartiment sont collectées et comptabilisées. Une « courbe de rétention » de mémoire peut être obtenue en testant différentes populations de mouches d'une même souche à différents temps après le conditionnement révélant ainsi le déclin de la mémoire en fonction du temps.

d- Calcul du score ou indice de performance

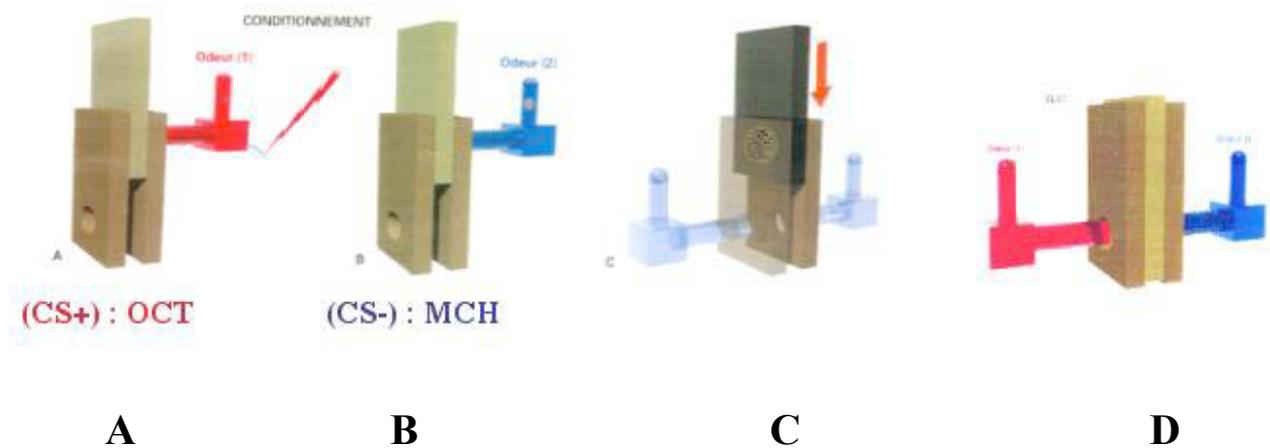
On calcule dans un premier temps un indice de performance, λ_1 , qui rend compte de la part de la population de drosophile qui s'est souvenue qu'une odeur était associée à un stimulus négatif. Ce λ_1 est défini comme le nombre de mouches ayant évité l'odeur associée aux chocs électriques, moins le nombre de mouches ayant choisi cette odeur, le tout divisé par

la population totale. En effet, les mouches s'étant dirigées vers le « mauvais » côté, ne l'ont pas fait sciemment, et ont donc choisi au hasard ce côté. Il y en a donc également autant du « bon » côté. On calcule de ce fait le nombre de mouche qui s'est effectivement souvenu de l'association odeur et chocs électriques. Pour éviter un biais dû aux natures des deux odeurs, de leur concentration et de leur reconnaissance variables par les souches mutantes, des variations des débits d'air, ou bien des phéromones laissées par un groupe précédemment conditionnée, chaque lignée est conditionnée deux fois. Dans un premier temps, on associe les chocs électriques avec l'odeur A, puis lors d'un second conditionnement avec l'odeur B. On obtient alors un second λ_2 , et l'indice de performance globale, IP, est la moyenne des deux λ .

Le schéma figure 2 synthétise le déroulement de ce paradigme, ainsi que le calcul des scores de mémoire.

Ayant mis en évidence des capacités d'apprentissage et de mémorisation chez la drosophile, et disposant d'outils précis d'étude, il faut s'intéresser aux différentes formes de mémoire.

Figure 2 : Protocole d'apprentissage olfactif par renforcement négatif chez la drosophile



$$\text{Score } \lambda_1 = \frac{(\text{CS-}) - (\text{CS+})}{(\text{CS+}) + (\text{CS-})}$$

$$\text{Indice de performance} = \frac{(\lambda_1 + \lambda_2)}{2}$$

L'appareil de conditionnement est composé : d'un tube d'entraînement recouvert d'une grille électrifiable, de deux tubes, au niveau desquels test se fait, d'un compartiment glissant, qui permet de transférer les mouches du tube d'entraînement au lieu de choix des odeurs.

Conditionnement (A et B): Les mouches sont exposées à une première odeur associée à un choc électrique, puis à une deuxième odeur sans choc électrique.

Test (C et D): Les mouches sont transférées dans une chambre où convergent les 2 odeurs. Les mouches ont la possibilité de se diriger vers l'une ou l'autre odeur. Au bout de 2 minutes, le nombre de mouches dans chacun des tubes est comptabilisé et un score (indice d'apprentissage) est calculé. L'évolution de ce score au cours du temps permet de suivre la mémoire des mouches.

Mesure de l'indice d'apprentissage : deux demi-scores ($\lambda/2$) sont calculés à partir des deux odeurs réciproques. Le score final (λ) correspond à la moyenne de ces deux demi-scores.

CS- : nombre de mouches du côté de l'odeur non associée au choc électrique.

CS+ : nombre de mouches du côté de l'odeur précédemment associée au choc électrique.

OCT : 3 - Octanol **MCH :** 4 – methylcyclohexanol

Selon Tully, et Quinn, 1985.

C La mémoire olfactive chez la drosophile

I Les différentes phases de mémoire

Il est possible d'étudier la rétention de mémoire après une procédure de conditionnement olfactif. En faisant varier l'intervalle de temps entre la phase de conditionnement et la phase de test, on peut établir une courbe de rétention mnésique. La performance de la souche de référence sauvage C.S. diminue en fonction du temps. Alors que juste après le conditionnement le score d'apprentissage est de 85%, trois heures après l'indice de performance est d'environ 50 %. D'autres expériences comportementales, toujours basées sur cette procédure d'apprentissage associatif, ont permis de s'intéresser aux différentes formes ou composantes de la mémoire. La mémoire à court terme, qui s'étend de quelques secondes à plusieurs minutes, est supposée reposer sur des changements d'efficacité synaptique produits par des altérations physiologiques rapides et transitoires dans les neurones donnés. Par contre, la mémoire à long terme, qui perdure de plusieurs jours à la vie entière, est supposée se former sur des changements d'efficacité synaptique durable, et être accompagnée de restructurations synaptiques morphologiques induites par des modifications de l'expression génique.

a- L'apprentissage

L'apprentissage, ou LRN (learning), correspond à la phase d'acquisition d'une réponse conditionnée durant l'entraînement. Il consiste à acquérir ou à modifier une représentation de l'environnement. Ce processus cognitif permet à un animal d'utiliser son expérience passée pour assimiler l'organisation de son environnement et les conséquences de ses propres actions, afin de s'y accommoder.

b- La mémoire à court terme

La mémoire à court terme, ou MCT (mémoire à court terme), est induite durant l'acquisition, atteignant un niveau maximal juste après entraînement (un cycle), puis revient à 0 dans les heures suivantes. Une expérience simple a permis de démontrer l'existence de deux

composantes de la mémoire à court terme. Des mouches soumises à une température de 4°C perdent une partie de l'information stockée. Il y a eu anesthésie par le froid. Cette approche montre qu'après apprentissage, l'information est stockée en parallèle de deux manières différentes : l'une de ces voies est sensible au froid et correspondrait à un stockage de l'information sous forme d'activité électrique du réseau neuronal, et l'autre serait insensible au froid et supportée par les modifications moléculaires plus stables.

c- La mémoire à moyen terme

La MTM (Middle Term Memory) dépend de la MCT et atteint son maximum dans l'heure qui suit un cycle d'entraînement, puis disparaît dans les quelques heures suivantes. Elle est sensible aux anesthésies par le froid et est abolie chez les mutants *amnesiac* (*amn*). Le mutant (Quinn, Sziber et al., 1979), également isolé après une mutagenèse à l'EMS, présente un score d'apprentissage presque sauvage mais une mémoire qui disparaît plus précocement. Pour *amn*, les phases tardives de mémorisation correspondant à ce type de mémoire semblent spécifiquement affectées (Tully and Quinn 1985). Il interviendrait ainsi dans la transition de la mémoire à court terme vers la mémoire à moyen terme, car les mutants *amn* semblent apprendre convenablement mais oublier très vite (après moins d'une heure).

d- Les mémoires consolidées : MRA et MLT

La MRA (mémoire résistante à l'anesthésie) est induite après un cycle d'entraînement, dix cycles massés, ou dix cycles espacés. Elle dépend de la MTM et atteint son maximum dans les deux heures suivantes l'entraînement et diminue dans les quatre jours suivants après un conditionnement de dix cycles massés. Il s'agit d'une forme de mémoire consolidée absente chez les mutants *radish* (*rsh*). Le mutant *rsh* a une mémoire consolidée inexistante après un entraînement massé, alors que la mémoire à long terme (MLT) est normale à deux jours. Il a été montré que l'administration dans la nourriture d'un inhibiteur de synthèse protéique, le cycloheximide ou CXM, inhibe la formation de la MLT (Tully, Preat et al., 1994) comme présenté sur la figure 3. Chez les mutants *rsh* l'administration de CXM reste sans effet sur la mémoire consolidée qui disparaît en deux jours. *Rsh* serait donc impliqué dans la mémoire à long terme indépendante de la synthèse protéique.

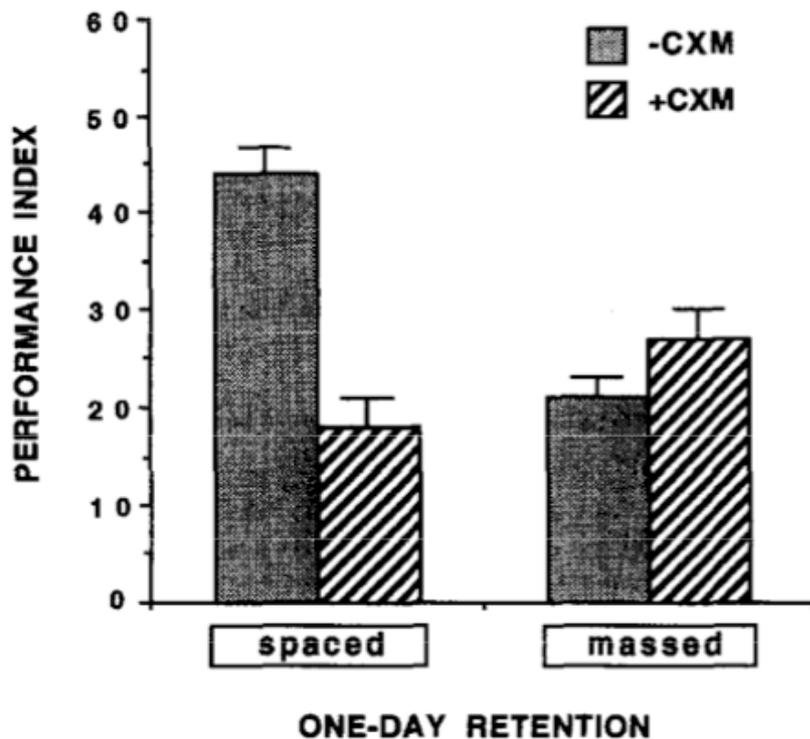


Figure 3 : Importance de la synthèse protéique pour la MLT

Un entraînement massé induit une mémoire consolidée insensible au CXM. Son IP se situe vers 25. Un entraînement espacé par contre induit des scores de 40, mais est sensible au CXM. Le CXM a un effet uniquement sur la composante de mémoire consolidée générée par les entraînements espacés. Le score de 20 observé est dû à l'autre forme de mémoire à long terme que l'on observe avec les entraînements massés. Cette expérience prouve la dépendance de la MLT pour la synthèse protéique. D'après Tully *et al.*, 1994.

La MLT est quant à elle uniquement induite après dix cycles de conditionnement espacés. Cette forme de mémoire est abolie lorsque les mouches sont nourries avec l'inhibiteur de synthèse protéique, le CXM. Elle dépend de la MTM, atteint son maximum un jour après l'entraînement et ne montre aucune baisse substantielle dans les jours qui suivent. Elle est dépendante du contrôle des protéines, et dure au moins jusqu'à sept jours.

Les figures 4 et 5 qui suivent permettent d'observer les courbes de rétention des différentes mémoires induites en fonction des différents protocoles de conditionnement, ainsi que leurs caractéristiques.

Figure 4 : Durée de vie des différentes phases de mémoire

La MCT atteint de suite son maximum et disparaît dans l'heure qui suit. La MTM atteint son maximum 1h après un cycle de conditionnement et dure jusqu'à 4-5h. Elle coexiste avec la MRA qui perdure au moins 1 jour, et peut être détectée jusqu'à 4 jours. Enfin la MLT qui n'apparaît qu'après un protocole espacé dure au delà de 24h.

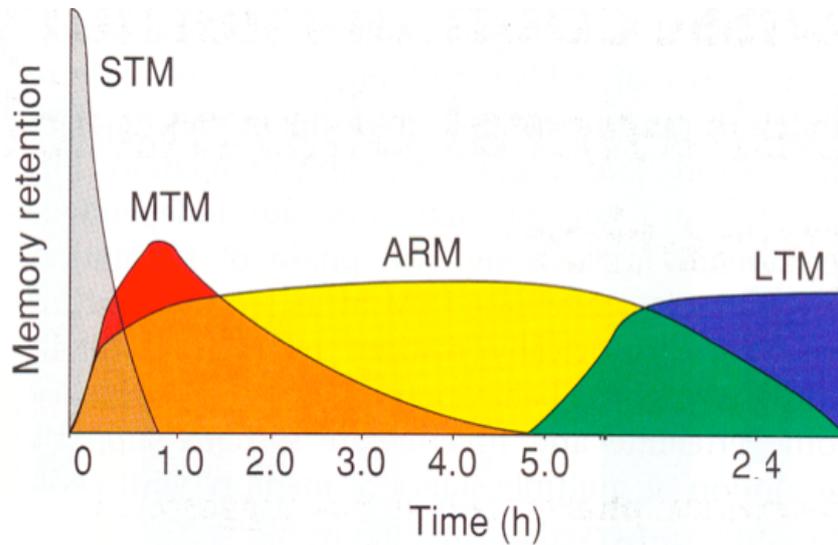
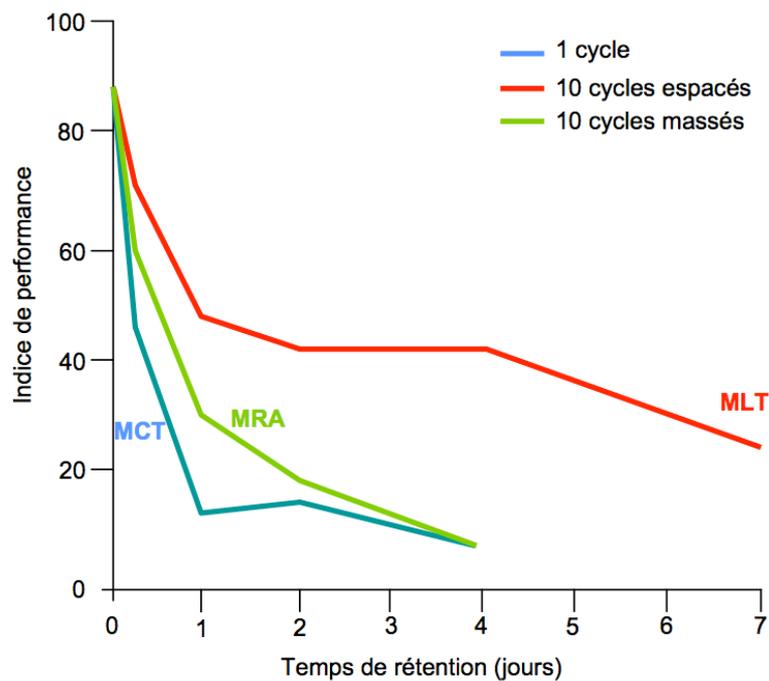


Figure 5 : Courbes de rétention des phases de mémoire

Après 10 cycles espacés, induction de MLT qui persiste jusqu'à 7 jours. Elle présente un score théorique de 40 après 24 h. Après 10 cycles massés, induction de la MRA qui peut persister jusqu'à 4 jours. A 24 h, son indice de performance est de 30. Après un seul cycle, induction d'une mémoire labile.



II Le système nerveux central de la drosophile

Des connaissances sur la structure du cerveau sont indispensables pour une étude approfondie de ses propriétés de stockage de l'information. Il faut, avant de pouvoir disséquer les mécanismes qui sous-tendent la mémoire olfactive, comprendre comment cette information est intégrée par le système nerveux. Le cerveau de drosophile est constitué d'environ 100000 neurones (Shimada, 2005). Ces neurones sont unipolaires et leurs corps cellulaires sont massés à la périphérie du cerveau, alors que les projections axonales et dendritiques se regroupent en masse et forment le neuropile. Le neuromère le plus intéressant du cerveau de drosophile est le protocerebrum. Il est constitué de 4 structures chez l'adulte aux fonctions connues :

- Le complexe central, impliqué dans le contrôle locomoteur général de la mouche (environ 20000 neurones).
- Les lobes optiques, constitués d'environ 160000 neurones.
- La *pars intercerabralis* dans la partie antérieure composée de neurones neurosécréteurs ascendants et descendants. Certains d'entre eux envoient des projections de la partie dorsale vers la partie centrale du cerveau pour se terminer dans des organes neuroendocriniens impliqués dans des fonctions diverses comme la mue et la synthèse d'hormone juvénile.
- Les corps pédonculés, dont la fonction est intimement liée à celle des lobes antennaires, sont impliqués dans de nombreux phénomènes dont l'apprentissage et la mémoire olfactive. Les corps pédonculés sont des structures caractéristiques du cerveau des insectes dont l'organisation est particulièrement bien conservée chez la plupart d'entre eux.

L'ablation chimique des corps pédonculés abolit l'apprentissage et la mémoire olfactive

Plusieurs études ont permis d'établir que les corps pédonculés des insectes étaient impliqués dans l'apprentissage olfactif. Des lésions chirurgicales des corps pédonculés chez la fourmi ou chez l'abeille et l'utilisation de produit chimique -empêchant le développement de cellule en division- chez la drosophile ont révélé une détérioration voire une perte de la mémoire olfactive chez ces individus. Chez la drosophile, De Belle et Heisenberg (de Belle et Heisenberg 1994) ont mené des expériences avec de l'hydroxy-Urée (drogue qui détruit les cellules en divisions). En donnant du HU à des jeunes larves on détruit les neuroblastes en division, soit un neuroblaste des lobes antennaires et les 4 neuroblastes qui donnent naissance aux MBs. Les mouches qui naissent des larves ayant subi ce traitement n'auront pas de corps pédonculés. Les auteurs de ces expériences ont pu alors montrer que ces mouches n'avaient aucune capacité d'apprentissage olfactif. La réactivité aux chocs électriques, la sensibilité aux différentes odeurs, et le comportement locomoteur ne sont en aucun cas affectés. Cette perte de capacité d'apprentissage olfactif est très spécifique. En effet les mouches dépourvues de corps pédonculés se comportent normalement lors des tests d'apprentissage visuel et tactile (Wolf, Wittig et al., 1998)

III Une structure particulière : les corps pédonculés

a- Description

Les corps pédonculés constituent une structure bilatérale formée de deux sous structures symétriques. Chacune d'entre elles est composée d'environ 2500 neurones appelés cellules de Kenyon (Crittenden, Skoulakis et al., 1998). Les corps cellulaires des cellules de Kenyon sont situés dans la partie dorsale et postérieure de chaque hémisphère et forment un groupe très dense de corps cellulaires, de taille relativement petite. Ils envoient leurs branches

dendritiques dans une région de forme glomérulaire appelée le calice. Ces branches sont des éléments post-synaptiques et reçoivent des signaux afférents de la voie olfactive des lobes antennaires. Les axones des cellules de Kenyon convergent alors sous le calice et forment un large faisceau de fibres parallèles très resserrées appelé le pédoncule, qui traverse le cerveau (figure 6).

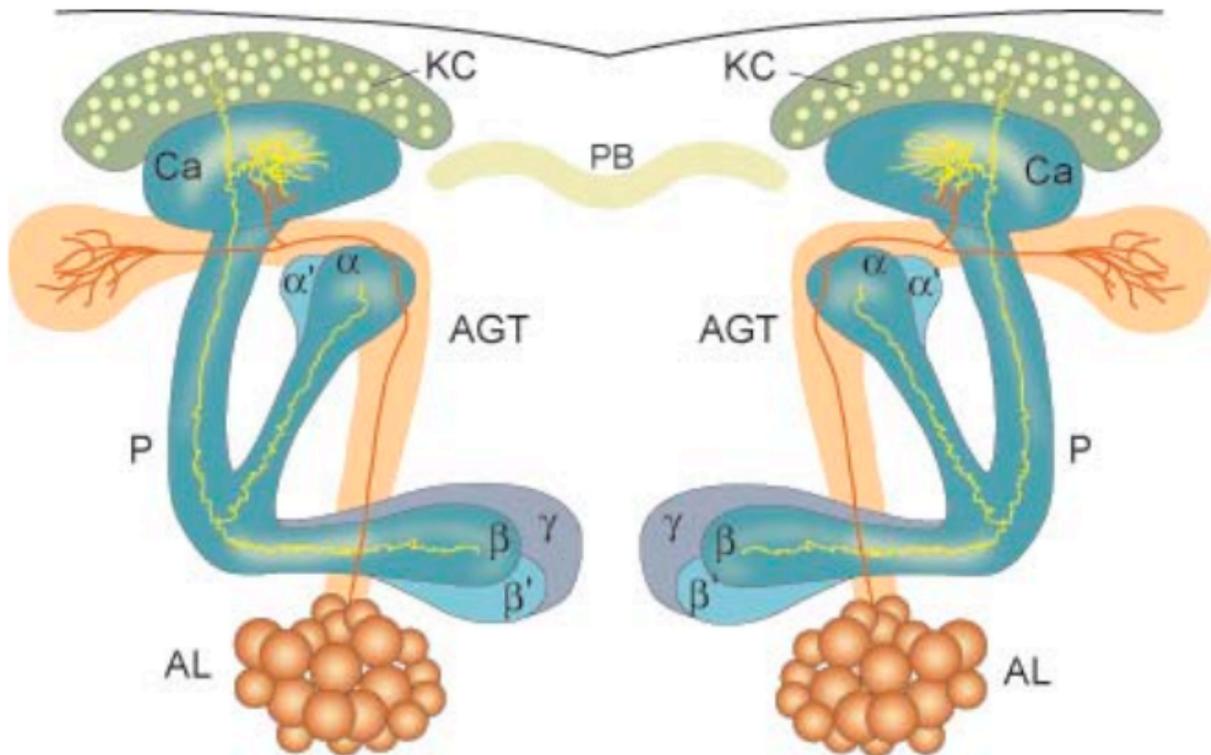


Figure 6 : Schéma des neurones des corps pédonculés

Les calices (Ca) contiennent les arborescences dendritiques des cellules de Kenyon (KC). Les axones de ces cellules projettent rostralement au sein des pédoncules en donnant naissance à différents lobes : deux verticaux α et α' ; et trois horizontaux β , β' , et γ .

Ce dernier se divise pour continuer dans deux directions principales et se projeter pour former les lobes. Trois faisceaux distincts se dirigent vers l'axe de symétrie et forment les lobes β , β' et γ . Deux autres se dirigent dorsalement et forment les lobes verticaux α et α' . Les lobes α et β d'une part, et α' et β' d'autre part sont constitués d'axones provenant des mêmes neurones. Des coupes frontales du cerveau révèlent que les lobes médiaux sont accolés les uns aux autres, de même que les lobes dorsaux chez l'adulte. On distingue donc trois types de cellules de Kenyon : les axones avec une bifurcation au niveau du talon α'/β' et α/β et les axones sans bifurcation dans le lobe γ et le talon (Ito, Awano et al., 1997; Ito, Suzuki et al., 1998).

b- Développement des corps pédonculés

Chaque corps pédonculé est issu de 4 neuroblastes localisés dans chaque hémisphère du cerveau. L'analyse du développement des cellules de Kenyon sur des clones mitotiques marqués (Mosaic Analysis with Repressible Cell Marker) (Lee, Lee et al., 1999) a indiqué que les trois différents types de neurones des corps pédonculés sont générés séquentiellement au cours du développement (figure 7). Les neurones γ naissent jusqu'au milieu du troisième stade larvaire; les neurones α'/β' naissent entre le milieu du stade larvaire 3 et le début de la pupaison; et enfin les neurones α/β naissent à partir de la pupaison. Les corps pédonculés embryonnaires sont donc exclusivement constitués des fibres γ médialement et dorsalement. C'est le développement de ces quatre neuroblastes qui donne un corp pédonculé (figure 8).

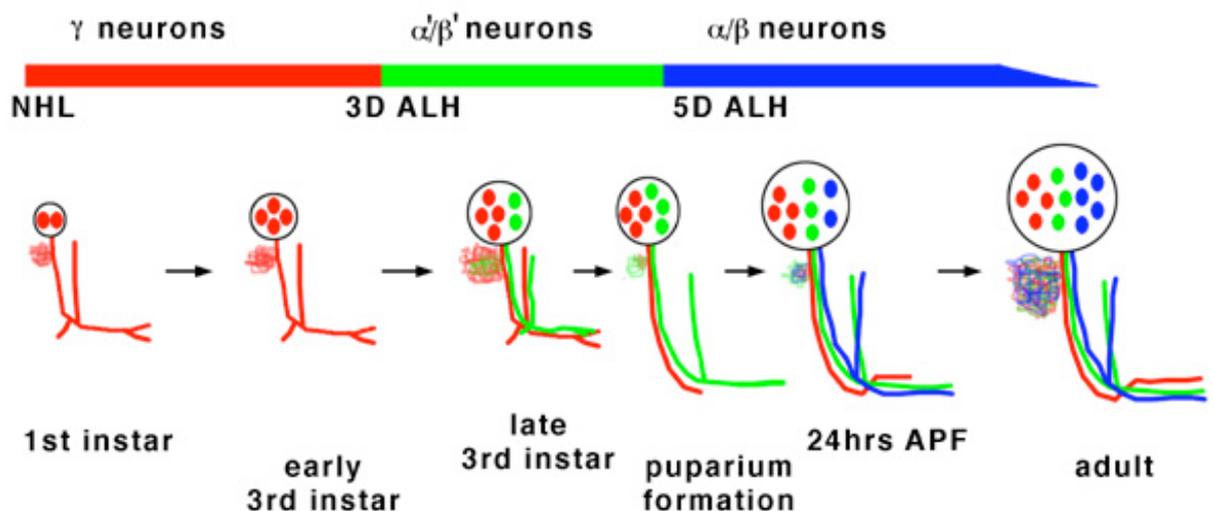


Figure 7 : Schéma du développement des corps pédonculés

Chaque corps pédonculé dérive de 4 neuroblastes identiques dans chaque hémisphère. Par division asymétrique au cours des différents stades de développement, chaque corps pédonculé génère environ 2500 neurones, classés en 3 catégories en fonction de leur axe de projection. Ces 3 types de neurones des corps pédonculés naissent dans un ordre spécifique. Les neurones γ (rouge) apparaissent avant le milieu du 3^e stade larvaire, les α'/β' (vert) entre le milieu du 3^e stade larvaire et le stade pupale, et le α/β (bleu) après ce dernier stade. Pendant le début de la métamorphose, les axones et les dendrites des neurones γ dégèrent partiellement et de nouvelles projections se forment mais uniquement en suivant l'axe médian. Les lobes α'/β' ne subissent quant à eux que peu de transformation durant la métamorphose. Les lobes et α/β naissent quant à eux pendant la métamorphose et ne subissent pas de remaniement. (Lee, Lee et al., 1999).

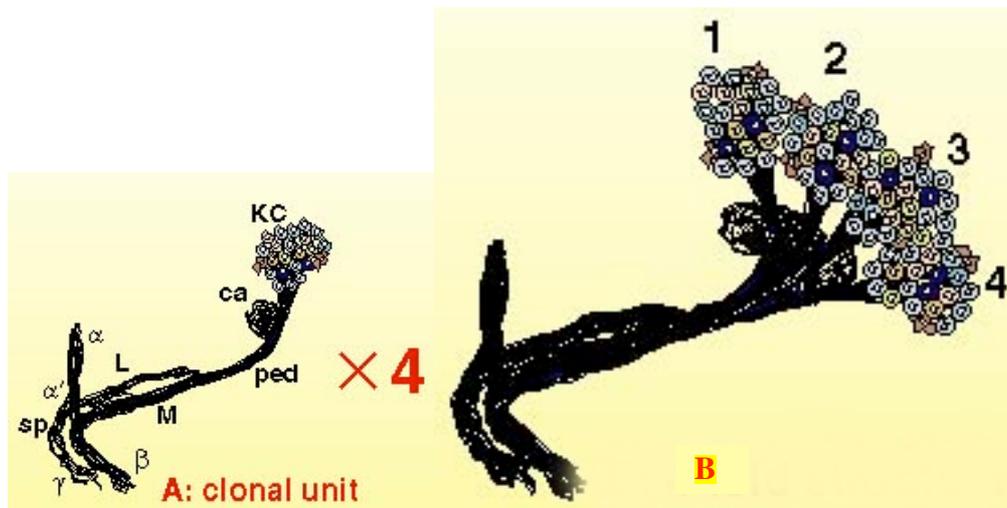


Figure 8 : Schéma de la structure des corps pédonculés

A : Chaque neuroblaste génère une unité clonale contenant des cellules gliales et de Kenyon. Ces dernières (KC) sont représentées de couleur différente. ca : le calice ; ped : le pédoncule ; sp : talon. L et M représentent respectivement les projections latérales et médianes. Les lobes α , β et γ sont les projections axonales des cellules de Kenyon.

B : Les 4 neuroblastes étant équivalents, les cellules issues de chacun d'entre eux participe de manière comparable à l'ensemble de la structure des corps pédonculés. (Ito, Awano et al., 1997; Ito, Suzuki et al., 1998).

IV Intégration des informations olfactives

Chez la drosophile, les odeurs sont détectées par une soixantaine de protéines réceptrices olfactives, chacune étant exprimées dans les neurones récepteurs olfactifs (ORN) situés au niveau des poils sensitifs sur les antennes (Davis 2004). Ces ORN projettent ensuite leurs axones via le nerf antennaire (AN), au niveau des glomérules dans les lobes antennaires (AL). Il y a 43 glomérules dans chaque lobe antennaire. Chaque ORN exprimant les mêmes protéines réceptrices olfactives projettent sur le même glomérule (Laissue, Reiter et al., 1999; Gao, Yuan et al., 2000; Vosshall, Wong et al., 2000; Scott, Brady et al., 2001). Dans ces lobes antennaires, les ORN forment des synapses excitatrices sur les neurones de projections (LH), mais également sur les interneurones locaux (LN). Ces interneurones sont GABAergiques et étendent également leur ramification de manière extensive sur les glomérules. L'information

est une première fois intégrée dans ces glomérules et est ensuite transmise aux corps pédonculés et au lathéral horn (LH) (Jefferis, Martin et al., 2001; Martin, Jefferis et al., 2002; Wong, Wang et al., 2002). L'ensemble de ces informations est schématisé sur la figure 9.

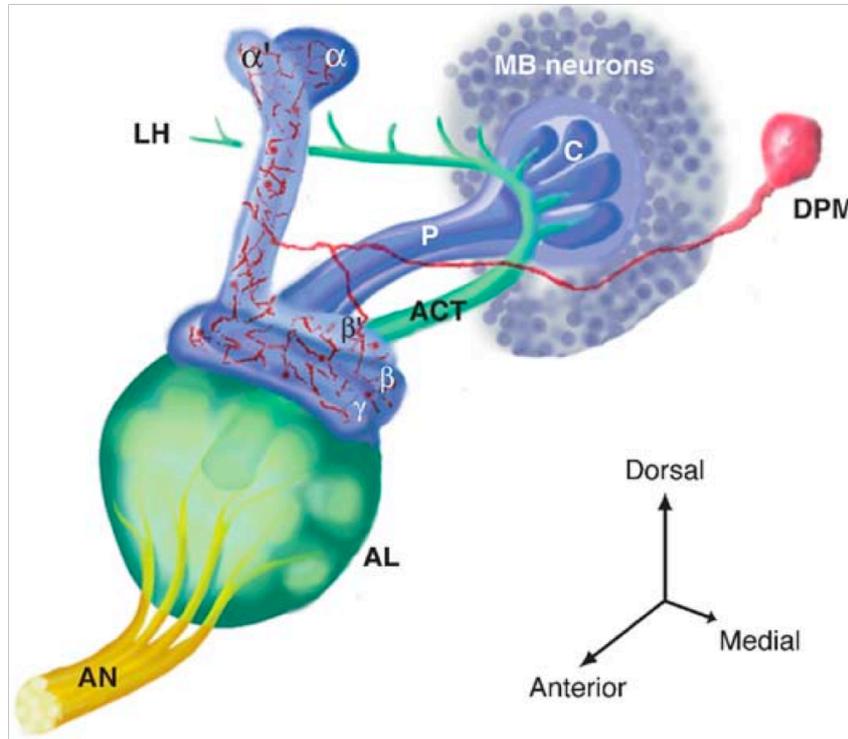


Figure 9 : Schéma d'intégration des informations olfactives par le système nerveux

Les odeurs sont détectées au niveau des antennes et remontent jusqu'aux lobes antennaires (AL), pour atteindre les glomérules représentés en vert. L'information est ensuite relayée par les neurones de projection vers les corps pédonculés et le latéral horn (Keene and Waddell 2007).

Les corps pédonculés sont une structure fondamentale dans les processus d'apprentissage de l'information olfactive. Les mutants anatomiques de cette région du cerveau présentent des défauts de mémoire sans pour autant affecter l'olfaction ou la locomotion. Néanmoins certains mutants des MBs présentent des défauts de locomotion mais pas dans les machines à test que nous utilisons (Martin et al., 1999). Ainsi, avant de détailler de l'intégration des différentes informations, et de discuter des multiples phases de mémoire et de leurs interactions, il est nécessaire de présenter préalablement les différents gènes connus pour avoir un rôle établi dans les phénomènes de mémorisation chez la drosophile.

V D'autres structures impliquées dans la mémoire

Bien que les corps pédonculés, comme nous venons de le voir, ont un rôle central dans l'apprentissage chez la drosophile, ce n'est néanmoins pas la seule structure cérébrale à avoir un rôle dans les processus de mémorisation. Au cours de ces dernières années de nombreuses expériences ont mis en avant l'implication de neurones extrinsèques aux corps pédonculés ainsi que d'autres sites anatomiques pour la consolidation de la mémoire.

a- Les DPM

En premier lieu, les DPM (Dorsal Paired Medial Neuron ou DPM), qui participent via le produit du gène *amnesiac* à la mise en place de la mémoire (Waddell, armstrong et al., 2000).

b- Les cellules gliales

En 2004, l'équipe de Thomas Prémat a montré que le gène *crammer* qui régule la mise en place de la mémoire à long terme est exprimé dans les cellules gliales qui entourent les corps pédonculés (Comas, Petit et al., 2004).

c- Autres structures

De plus plusieurs lignées enhancer-trap présentant des patrons d'expression ailleurs que dans les corps pédonculés ont été identifiées lors de cribles comportementaux pour des déficits mnésiques (Dubnau, Chiang et al., 2003). Enfin, une structure asymétrique au sein du complexe central semble influencer sur la formation de la mémoire à long terme (Pascual A., Huang, K.L., et al., 2004)

d- L'ellipsoid body

En 2007 l'équipe du Pr Tim Tully a démontré l'implication d'une nouvelle structure dans la formation de la mémoire (Wu et al., 2007). En combinant des approches moléculaires et génétiques, ils ont montré que le gène *dNR1* codant un récepteur au NMDA, homologue à ceux présents chez les mammifères, jouait un rôle dans la mémoire associative chez la

drosophile (Xia, Miyashita et al., 2005). Ce récepteur est exprimé faiblement dans l'ensemble du cerveau. Néanmoins les neurones de taille plus importante présentent des marquages plus intenses. Ils ont par la suite construit un RNAi contre ce gène dont ils ont conduit l'expression soit dans les corps pédonculés, soit dans l'ellipsoid body. Dans ce dernier cas la mémoire à long terme est spécifiquement affectée (en particulier la consolidation), alors que sur-exprimer ce RNAi dans les corps pédonculés affecte les phases de mémoire plus précoces. Ces résultats montrent clairement l'implication d'un nouveau site anatomique pour la formation de la MLT, mais aussi l'existence de différents niveaux de consolidation de celle-ci.

e- Les neurones dopaminergiques

La dopamine ou DA est un neuromodulateur impliqué dans le renforcement appétitif chez l'homme et l'aplysie (Mirenowicz and Schultz 1996), mais requis dans le conditionnement aversif chez la drosophile (Schwaerzel, Monastirioti et al., 2003). En combinant un pilote d'expression mimant celui des neurones dopaminergiques, et l'allèle thermosensible Shibire, Shwaerzel et ses collègues ont montré que le blocage de ces neurones durant l'acquisition bloque la MCT. Des expériences d'imagerie confirment ces données (Riemensperger, Voller et al., 2005)

VI La mise en place de la mémoire olfactive au sein des corps pédonculés fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires

La génétique tend à comprendre le vivant à travers l'étude des mutants. Ainsi pour conceptualiser la formation de la mémoire olfactive chez la drosophile, il a fallu au départ identifier des gènes responsables d'un dysfonctionnement comportemental. Aujourd'hui plus d'une vingtaine de gènes sont connus pour avoir un rôle dans la formation de la mémoire, et la plupart d'entre eux présentent une expression préférentielle au niveau des corps pédonculés. C'est d'ailleurs grâce à leur mise en évidence, que le rôle des corps pédonculés dans la formation de la mémoire est désormais considéré comme acquis.

Ainsi une expression au niveau des corps pédonculés seulement n'est pas un argument suffisant pour hypothéquer de son rôle dans les processus mnésiques, mais l'expression

préférentielle de nombreux acteurs moléculaires dans ces neurones rend hautement probable ce postulat. Nous verrons d'ailleurs que certains gènes nécessaires la mise en place de la mémoire ne s'expriment pas dans les corps pédonculés, mais dans des structures afférentes.

a- La voie de l'AMPC

Dunce (dnc)

Le premier mutant de mémoire à avoir été isolé est *dunce* (Dudai, Jan et al., 1976). Il a été découvert dans le laboratoire du Seymour Benzer comme étant un mutant présentant de faibles capacités d'apprentissage malgré une réactivité aux stimuli normale. Initialement cartographié sur le chromosome X, des études menées dans d'autres laboratoires ont montré que cette région chromosomique avait un rôle concernant l'activité phosphodiesterase productrice d'AMPC. Il a fallu attendre plus de dix ans pour démontrer que les mutants *Dnc* étaient déficients dans cette activité phosphodiesterase. (Byers, Davis et al., 1981). Ce n'est qu'en 1986 que *dnc* fut caractérisé comme étant une phosphodiesterase AMPC dépendante (Chen, Denome et al., 1986). Une confirmation supplémentaire de son rôle dans la mémoire a été apportée lorsque le cDNA de *dnc* de drosophile ou de son homologue chez le rat fut exprimé chez des mutants *Dunce*, permettant un sauvetage partiel du mutant hypomorphe (Dauwalder and Davis 1995). L'étude de son patron d'expression montra que le gène est préférentiellement dans les corps pédonculés (Nighorn, Healy et al., 1991). C'est la première fois qu'une étude du patron d'expression a permis de faire le lien entre un mutant d'apprentissage et de mémoire et les corps pédonculés. Ce résultat fut ensuite confirmé par hybridation in situ.

Rutabaga (rut)

À la suite de la découverte de *dnc* en tant que mutant de mémoire, et élément important de la voie de signalisation de l'AMPC, la plupart des mutants découverts par la suite furent suspectés d'intervenir également dans l'activité de cette voie. En 1984, *Rutabaga* a été découvert et il a été démontré que ce gène, responsable d'un phénotype perte de mémoire, code une adénylate-cyclase de type I. Les mutants *rut* présentent une déficience dans l'activité adénylate-cyclase dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline (Livingstone, Sziber et al., 1984). Le séquençage du locus de *rut*¹ a montré que le phénotype n'était dû qu'à une simple mutation, où une arginine était substituée par une glycine, en position 1026, au niveau du site

catalytique de la cyclase (Levin, Han et al., 1992). Des marquages immunohistochimique, et des expériences d'hybridation in situ ont démontré comme pour *dnc* une expression préférentielle de *rut* au niveau des neurones des corps pédonculés. Néanmoins la preuve du rôle de *rut* dans la mémoire est venue d'expériences de sauvetage en utilisant le système Gal4/UAS. Un transgène codant la protéine rut a été exprimé au niveau des corps pédonculés chez des mutants *rut*²⁰⁸⁰, permettant ainsi un sauvetage du phénotype de perte de mémoire (Zars, Wolf et al., 2000). Mais une critique importante fut émise concernant le mutant *dnc*. En effet, le rôle des adénylate-cyclases dans le développement du cerveau est très largement documenté dans la littérature (McGuire, Le et al., 2003). On ne peut dès lors différencier un réel mutant de mémoire d'un mutant de développement dont les effets sur la structure du cerveau ne sont pas observables. Ce problème a par la suite été résolu grâce à l'utilisation de promoteurs inductibles. Que ce soit avec le répresseur thermosensible de levure Gal80ts, ou avec l'hybride entre Gal4 et le récepteur humain de la progestérone Gene Switch, plusieurs équipes ont exprimé le transgène Rut uniquement à l'état adulte ou au stade larvaire chez des mutants *rut*²⁰⁸⁰ (Mao, Roman et al., 2003; McGuire, Mao et al., 2004). Ils ont montré que l'induction de l'expression de *rut* uniquement au stade adulte est suffisante pour sauver le phénotype, alors qu'une expression seulement au cours du développement ne l'est pas. Enfin en 1988, Dudai a proposé un rôle de détecteur de coïncidence pour *rutabaga*, à la convergence des informations olfactives et électriques (Dudai 1988).

PKA

Un troisième composant de la voie de signalisation de l'AMPc a par la suite été découvert pour son implication dans l'apprentissage et la mémoire de la drosophile. La protéine kinase A AMPc dépendante (*PKA*) est un acteur majeur de cette voie (Taylor, Buechler et al., 1990). Après la découverte de *dnc*, codant une phosphodiesterase (Chen, Denome et al., 1986), et Rut codant une adénylate cyclase dépendante de l'AMPc (Livingstone, Sziber et al., 1984), Drain et son équipe ont testé en 1991 différents inhibiteurs inductible de la *PKA* pour tester son rôle dans la mémoire (Drain, Folkers et al., 1991). Ils ont démontré que l'induction d'un peptide inhibiteur de la *PKA* avant le conditionnement avait un effet sur la mémoire. Alors que l'induction d'un peptide tronqué était sans effet. Il s'agit de la première évidence d'un rôle physiologique de la *PKA* dans les processus de mémorisation. Par la suite Skoulakis et ses collègues ont étudié un mutant de la sous-unité catalytique de la

PKA, *DCO* (Skoulakis, Kalderon et al., 1993). Différentes combinaisons génétiques ont montré que l'activité de la *PKA* était diminuée chez les mutants *DCO*, ce qui avait pour résultat d'augmenter de manière significative les défauts de mémoire chez la drosophile. Mais surtout, l'élément le plus important fut d'observer l'expression de la protéine au niveau des corps pédonculés. Il s'agit des trois composants les plus importants de la cascade biochimique de l'AMPC, qui sont nécessaires au processus mnésique, et sont tous exprimés au même endroit.

La *PKA* étant le premier effecteur en aval de la modulation de l'AMPC, elle agit sur de nombreuses cibles agissant de concert pour apporter aux niveaux cellulaire et moléculaire les changements nécessaires que nécessite la mise en place de la mémoire. Il a été montré que la *PKA* peut moduler les canaux potassiques (Zhou, Wang et al., 2002) calcium dépendant, mais aussi la libération de neurotransmetteur via le Ca^{2+} (Yoshihara, Suzuki et al., 2000). De nombreuses études ont fait également le lien entre la *PKA* et la plasticité synaptique (Baines 2004; Zhang, Duan et al., 2004). Le rôle de l'AMPC apparaît donc central dans la formation des processus mnésiques.

CREB

Une des cibles majeures phosphorylées par la *PKA* est le facteur de transcription *CREB* (*cAMP-Response Element Binding*). Lorsque la *PKA* phosphoryle *CREB*, celui-ci se retrouve dans une conformation active et permet l'expression de gène. Le gène *CREB* est complexe et code *via* un épissage alternatif pour sept différentes isoformes (Yin, Del Vecchio et al., 1995; Yin, Wallach et al., 1995). Une isoforme putative, dCREB2-a, est prédite pour être un activateur transcriptionnel, alors qu'une autre isoforme, dCREB2-b, serait au contraire dominant négatif quant à l'expression des gènes cibles de *CREB* via son activation par la *PKA*.

Des mouches transgéniques, contenant l'isoforme dCREB2-b sous le contrôle d'un promoteur inductible, ont montré un effacement de la mémoire à long terme dépendante de la synthèse protéique (Yin, Wallach et al., 1994). Il y aurait un blocage de la forme activatrice empêchant ainsi la mise en place de la mémoire à long terme. Ces expériences ont été reproduites plus tard, confirmant le rôle suppresseur de mémoire de l'isoforme dCREB-b (Perazzona, Isabel et al., 2004). Néanmoins il avait été initialement rapporté que la sur-

expression de la forme activatrice – toujours sous le contrôle d'un promoteur heat-shock inductible- conduisait à une amélioration de capacités mnésiques de la mouche. Les auteurs de cet article ont rapporté que ces mouches transgéniques étaient capables de produire de la mémoire à long terme, après des protocoles censés engendrer uniquement de la mémoire à court terme. Ces résultats sont aujourd'hui controversés. La même équipe ayant reproduit les expériences avec l'isoforme répressive n'a pu reproduire les résultats avec l'isoforme activatrice (Perazzona, Isabel et al., 2004). Une analyse plus en détail du transgène a révélé un codon stop dans le cadre de lecture. Aucune protéine fonctionnelle ne peut être produite avec ce transgène, ce qui laisse planer de sérieux doute sur les résultats antérieurs. De plus les modèles moléculaires qui prenaient en compte ces données n'ont toujours pas été remis à jour.

Amnesiac (*amn*) et les DPM

Un lien supplémentaire concernant l'implication de la voie de l'AMPC a été effectué avec l'identification du mutant *amnesiac amn* (Quinn, Sziber et al., 1979). Ce mutant, *amn19A*, a été identifié lors d'un crible, en condition dominante, de restauration de la fertilité femelle de *dunce*. À cette époque, le locus du gène *amn* fut initialement cartographié sur le chromosome X, mais sa caractérisation restait évasive. Ce n'est qu'en 1995 que son identification moléculaire fut effectuée lors d'un crible comportemental grâce à une lignée dont l'insertion de l'élément P empêcha toute complémentation avec le mutant *amn*. L'analyse moléculaire montra que le gène *amn* codait 3 neuropeptides putatifs, ayant une homologie avec un peptide activant l'adénylate cyclase (*PACAP, pituitary adenylyl-cyclase activating peptide*) (Feany and Quinn 1995). Un mécanisme général de régulation de l'AMPC fut immédiatement suggéré par Eric Kandel. Avec les découvertes de *rut*, *amn*, et *dnc*, tous les 3 impliqués dans la régulation de l'AMPC, il proposa un modèle où le neuropeptide *amn* modulerait le niveau d'AMPC via une protéine G couplé à une protéine réceptrice qui agirait sur l'adénylate cyclase *rut* (Kandel and Abel 1995).

En 2000, l'équipe de Waddell démontra que l'expression de *amn* est restreinte au niveau de seulement deux neurones, les neurones dorsaux associés médians (Dorsal Pair Neuron ou DPM) (Waddell, Armstrong et al., 2000). Conduire seulement l'expression d'un transgène *amn* au niveau de ces neurones était suffisant pour restaurer le phénotype sauvage. Ils démontrèrent également que bloquer la neurotransmission de ces neurones en utilisant le

transgène thermosensible *Shi^{ts}* durant la période de consolidation permettait de copier le phénotype du mutant *amn* (Waddell, Armstrong et al., 2000). Cette découverte permit de mettre en avant le rôle de DPM dans les processus mnésiques de la drosophile, et de ne plus seulement se focaliser sur les corps pédonculés. En parallèle, d'autres équipes travaillant sur *amn*, démontrèrent qu'exprimer *amn* tout au long du développement sauve également le défaut de mémoire (DeZazzo, Xia et al., 1999), alors qu'activer le transgène uniquement au stade adulte ne le sauve pas. Le gène *amn* est donc indispensable au cours du développement, mais est peut-être également requis à l'état adulte. La dynamique de son expression reste encore à élucider.

NF1

Chez l'homme, des mutations dans le gène de la neurofibromatose 1 sont responsables de tumeurs du système nerveux et de défauts d'apprentissage. Le gène codé est une protéine activatrice de *ras* GTPase (Xu, Lin et al., 1990). Chez la drosophile, l'homologue de NF1 est requis pour l'activation de l'adénylate cyclase *rut* via le peptide PACAP38, ce qui suggère un double rôle pour cette protéine, régulant de concert les voies *ras* et de l'AMPc (Guo, The et al., 1997). À partir de ces découvertes NF1 fut considéré comme un mutant potentiel de mémoire et fut testé comportementalement. Les individus déficients pour NF1 présentent des défauts de mémoire à court terme, qui peuvent être sauvés par l'expression d'un transgène NF1 ou par la surexpression de la sous unité catalytique de la PKA constitutivement active. Ce dernier point permet de mettre en évidence que les défauts mnésiques observés chez les mutants NF1 peuvent être dûs à un défaut de transduction du signal dans la voie de l'AMPc (Guo, Tong et al., 2000). Néanmoins la relation de NF1 avec la voie *ras* et le rôle de celle-ci dans la mémoire reste à prouver, de même qu'un rôle éventuel au niveau des corps pédonculés.

b- Les molécules d'adhésion cellulaire et les récepteurs membranaires

Volado (Vol)

La découverte de *volado* comme mutant de mémoire à court terme a permis de mettre en évidence le rôle des molécules d'adhésion cellulaire dans les mécanismes d'apprentissage. Ce gène code une sous unité de l'intégrine α (Grotewiel, Beck et al., 1998).

Vol a été identifié sur la base de son expression préférentielle au sein des corps pédonculés. Le phénotype mutant a pu être sauvé lors d'expériences de sauvetage en exprimant *volado* juste avant le conditionnement. Néanmoins, la localisation exacte où la protéine est requise n'est pas encore déterminée. *Vol* a également été mis en évidence pour réguler la transmission synaptique et la plasticité au niveau de la jonction neuromusculaire chez la larve (Rohrbough, Grotewiel et al., 2000).

Fasciclin II (Fas II)

FasII est la seconde molécule d'adhésion cellulaire découverte pour avoir un rôle dans la mémoire. Il a été identifié pour son expression préférentielle au niveau des corps pédonculés. Le crible comportemental a mis en évidence un défaut de mémoire à court terme. Bien qu'ayant un rôle important au cours du développement, l'induction d'un transgène par choc thermique, chez des individus mutants, avant l'apprentissage, permet un retour au phénotype sauvage. L'activation de ce transgène à un autre moment reste sans effet, suggérant ainsi un rôle de *FasII* uniquement lors de la formation de la mémoire et pas lors de la consolidation ou de la restitution (Cheng, Endo et al., 2001). *FasII* est un homologue du gène ApCAM chez l'aplysie qui est impliqué dans la plasticité synaptique (Martin and Kandel 1996). De plus, les variations de concentration de *FasII* régulent la plasticité pré-synaptique (Schuster, Davis et al., 1996). La protéine est fortement exprimée aux niveaux des lobes α/β et plus faiblement au niveau des lobes γ . Il reste néanmoins à déterminer si la fonction de *FasII* dans la mémoire à court terme est bien localisée au niveau des corps pédonculés.

Notch (N)

Du nématode à l'homme, les récepteurs transmembranaires de la famille *Notch* (N) agissent tout au long du développement embryonnaire et post-embryonnaire pour contrôler l'acquisition et le maintien d'un état différencié. Les récepteurs *Notch* sont connus pour participer à un large éventail de fonction et de voies de signalisation, allant de la spécification cellulaire via l'inhibition latérale, ou de la régulation de cônes de croissance. Plus de 1800 articles relatent les différents effets de mutation sur le gène *Notch* et des phénotypes qui en découlent, uniquement sur la drosophile. *Notch* est activé par le clivage de son domaine cytoplasmique via une activité gamma-secretase, effectué par la protéine PS1, composante

des présénilines. C'est cette même activité gamma-secretase, qui coupe la protéine APP au niveau C-terminal du peptide Abeta via PS1. Ainsi, il est possible d'envisager un lien entre un dysfonctionnement de la voie *Notch*, et la perte de mémoire observée chez les individus affectés par la maladie d'Alzheimer. Notch ainsi fait l'objet d'étude pour un rôle éventuel dans la mémoire. Des mutations thermosensibles de *notch* sont sans effet sur la mémoire à court terme, mais affectent la mémoire à long terme après un conditionnement espacé (Ge, Hannan et al., 2004; Presente, Boyles et al., 2004). De plus des allèles plus fort de *Notch*, dominant négatif, n'affecte pas la mémoire après un conditionnement massé. *Notch* semble donc impliqué uniquement dans la mémoire à long terme nécessitant la synthèse protéique. La surexpression de *Notch* entraîne une augmentation de la mémoire à 24h après un seul cycle de conditionnement. Cet effet est bloqué lorsqu'un inhibiteur de synthèse protéique est donné ce qui démontre encore le rôle de *Notch* dans la mémoire dépendante de la synthèse protéique (Ge, Hannan et al., 2004). Enfin, l'inhibition de *Notch*, via un RNAi uniquement au niveau des corps pédonculés, conduit à un défaut de mémoire à long terme, ce qui montre le rôle de *Notch* au niveau du site anatomique de mémorisation.

Notch est le représentant d'une nouvelle classe de molécules impliquées dans la mémoire à long terme. Bien que les mécanismes reliant *Notch* aux phénomènes de mémorisation restent à découvrir, il n'en reste pas moins un champ d'étude extrêmement intéressant, surtout aux vus de ses relations avec la maladie d'Alzheimer.

c- Les autres gènes

PKM atypique (aPKM)

Les isoformes atypiques des kinases PKC ont contrairement aux autres kinases conventionnelles une activité qui est indépendante du calcium ou de diacylglycérol. Des études d'électrophysiologie, concernant la potentialisation à long terme chez le rat, font état d'une augmentation de l'activité de la PKM durant la phase de maintenance de la potentialisation à long terme, d'une baisse de cette activité durant la phase de dépression, et un recrutement (Sacktor, Osten et al., 1993). Drier et al. en 2002 ont par la suite examiné son rôle dans la formation de la mémoire chez la drosophile (Drier, Tello et al., 2002). Ils ont démontré que l'induction, peu de temps après un conditionnement massé, d'un transgène contenant la version murine ou de drosophile de la PKM, augmentait la mémoire à un niveau

équivalent à celui du conditionnement espacé. Ces transgènes sont néanmoins sans effet après un protocole espacé. L'inactivation de la protéine, soit par transgénése, soit par des inhibiteurs spécifiques, a montré une baisse de la rétention mnésique après un conditionnement massé. Ces résultats mettent en évidence un rôle de la PKM dans la maintenance de la mémoire. D'autre part son abondance ou son activité après apprentissage est un facteur déterminant pour l'efficacité de l'apprentissage, comme en témoigne l'amélioration des scores de mémoire lors d'expérience de surexpression. Bien que le rôle physiologique normal de PKM atypique dans la mémoire consolidée ne soit pas encore à établi, celle-ci semble jouer un rôle important dans les processus mnésiques et semble être impliquée dans la stabilité de la mémoire en conditions physiologiques et la plasticité synaptique.

Leonardo (leo)

Le gène *leonardo* a été découvert au cours d'un crible, en se basant sur le patron d'expression restreint au niveau des corps pédonculés (Skoulakis and Davis 1996). 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. Ces dimères peuvent se lier à plus de 60 protéines différentes. Ceux-ci s'adhèrent plus ou moins fortement lorsque certaines séquences d'acides aminés spécifiques sont phosphorylés. Les protéines 14-3-3 peuvent alors s'associer à des protéines impliquées au niveau du cycle cellulaire, à des protéines des voies de signalisation, à des protéines de la réponse aux stress (dont l'apoptose), à des facteurs de transcription. Les liaisons à la 14-3-3 peuvent influencer : (1) les interactions entre les protéines, (2) la localisation cytoplasmique ou nucléaire des protéines, (3) la distance entre deux protéines, (4) l'activation ou l'inhibition de leur activité catalytique et (5) la déphosphorylation et/ou la protéolyse (Bridges D et Moorhead GBG, 2004). Les mutants *leo* ont un défaut d'apprentissage, impliquant les voies de signalisation des MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) ou de la protéine kinase C (Skoulakis and Davis 1996). De plus ces mutants ont des défauts de transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire, mais aussi des défauts post tétanique de potentialisation et des réminiscences de défaut de la voie de l'AMPc (Broadie, Rushton et al., 1997). Ce dernier point peut être dû à une potentielle interaction avec le canal potassium *Slowpoke* (Zhou,

Schopperle et al., 1999; Zhou, Reddy et al., 2003). Enfin en 2001 un transgène activé seulement à l'état adulte a permis de sauver le défaut comportemental (Philip et al., 2001).

Nalyot

Nalyot code un facteur de transcription *Adfl* relié à Myb. Ce dernier est un complexe qui a des rôles dans l'activation et la répression de nombreux gènes de développement, dont les mutations entraînent pour l'équivalent murins des tumeurs. Les mutants *nalyot* présentent une légère baisse de la mémoire à court terme, mais un important défaut dans la mémoire à long terme. D'un point de vue anatomique, des études au niveau de la jonction neuromusculaire ont montré des défauts de croissance synaptique. Enfin la surexpression d'*Adfl* au stade adulte entraîne un défaut de mémoire (DeZazzo, Sandstrom et al., 2000).

Radish (rsh)

Radish a été découvert au cours d'un crible comportemental dans le laboratoire de Quinn en 1993. Après un cycle d'apprentissage, bien que la mémoire à court terme soit normale, il présente des défauts mnésiques quelques heures plus tard. En effet, une heure après conditionnement les mutants *radish* ne sont pas différents des contrôles, alors que six heures plus tard ils présentent un score de 0. Ils sont assez proches d'un point de vue phénotypique des mutants *amn*, bien que ces derniers retiennent mieux six heures après apprentissage. De plus il s'agit d'une mutation semi-dominante. Les individus hétérozygotes pour *radish* présentent des scores intermédiaires, entre les individus sauvages et homozygotes pour *radish*. Enfin, et c'est le point le plus important, il s'agit d'un mutant spécifique de l'MRA, mémoire qui perdure après application d'un choc par le froid, à l'inverse des mutants *amnesiac* qui sont déficients pour la mémoire sensible à l'anesthésie par le froid (Folkers, Drain et al., 1993). Lorsque des animaux subissent un choc par le froid, 2h après un conditionnement classique, et sont testés 1h plus tard –soit 3h après apprentissage- ceux-ci présentent des scores de mémoire plus faible que des contrôles non anesthésiés. Une partie de la mémoire présente à 2h est déjà consolidée sous une forme stabilisée, résistante au froid, et une partie est encore labile. Or chez les mutants *radish*, cette mémoire pseudo-consolidée est abolie, suggérant un rôle du gène *radish* dans un processus de consolidation (Folkers, Drain et al., 1993; Tully, Preat et al., 1994).

L'équipe dirigée par Folkers et Quinn a identifié le gène *radish* récemment (Folkers et al., 2006). Ils ont directement cherché par bioinformatique les cadres de lecture incorrects chez les individus *radish*, aux alentours de la mutation. Ils ont alors identifié un nouveau gène ayant une mutation ambre, CG15720. Ils ont dans un premier temps fabriqué un anticorps polyclonal contre la protéine et observé un marquage au niveau des lobes des corps pédonculés, marquage absent chez les mutants *rsh*. Enfin ils ont construit un transgène contenant la protéine codée par le gène CG15720. L'induction de son expression par un choc thermique chez des mutants *rsh* permet de sauver le phénotype. La protéine identifiée présente de nombreux site de phosphorylation et semble se lier avec Rac1, une GTPase impliqué dans les réarrangement du cytosquelette (Formstecher et al., , 2005).

La voie Staufen/Pumilio

En 2003 l'équipe de Tim Tully procéda à un large crible dans le dessein d'identifier de nouveaux gènes de mémoire à long terme. Son équipe utilisa pour cela 2 méthodes. La 1^e méthode a été un crible comportemental, en recherchant des lignées présentant des défauts de mémoire à 24h. La 2^e, basée sur le concept de la synthèse protéique, est un criblage de gènes présentant des variations d'expression après conditionnement. Ils mirent ainsi plusieurs gènes en évidence, dont la fonction est la localisation des RNAm (Dubnau, Chiang et al., 2003) Pumilio, un inhibiteur de traduction, a été identifié via ces deux approches. Les autres gènes ont été identifiés grâce à l'analyse de puces à ADN. Parmi ceux-ci, on trouve *stau* (*stau*), impliqué dans la translocation de l'RNAm ; *moesin*, une protéine liant l'actine jouant un rôle dans la localisation de *stau* ; *orb*, impliqué dans la traduction de l'RNAm une fois que celui-ci a été transloqué et *eIF-2G*, un initiateur de traduction vraisemblablement lié à *orb*. Le crible comportemental a fait ressortir également *oskar*, gène connu pour la translocation des RNAm dépendants de *stau* et *eIF-5C*, un autre initiateur de traduction. Les mutations de *stau*, *pum*, *oskar* et *eIF-5C* ont pour conséquence un défaut de MLT. Ces résultats rejoignent l'idée que la translocation des RNAm et une traduction locale sont des processus importants dans l'établissement de la MLT.

Néanmoins, il est possible de se questionner sur la véracité du crible via l'analyse de puces à ADN. En effet, le contrôle utilisé est un pool d'ARN extrait de mouches conditionnées après un protocole massé. Bien que ne générant pas de mémoire à long terme nécessitant la synthèse protéique, ce type de conditionnement induit potentiellement un stress

beaucoup plus important du fait du rapprochement des cycles d'apprentissage. Le risque est alors d'avoir identifié des protéines liées au stress et de biaiser l'analyse.

Le complexe RNAi

La calcium/calmoduline dépendante kinase II ou CAMKII est un effecteur important dans la voie de signalisation du calcium. Cette dernière est impliquée dans la plasticité synaptique chez les mammifères (Kelleher, Govindarajan et al., 2004). En conduisant l'expression d'une CAMKII « taguée » au niveau des neurones projections qui relient le système olfactif aux corps pédonculés, l'équipe du Dr Ashraf a démontré le recrutement de la CAMKII au niveau post-synaptique des glomérules des lobes antennaires. En reproduisant l'expérience dans différents contextes, ils ont ainsi démontré l'intervention du complexe RISC dans la régulation synaptique de la synthèse protéique (Ashraf, McLoon et al., 2006).

Nebula (nla)

Chez l'Homme, le syndrome de Down est la plus importante cause de retard mental. La région spécifique du chromosome 21 est liée à plusieurs phénotypes de cette pathologie. Un gène de la famille des calcipressines est situé dans cette région, il s'agit de DSCR1 (*Down's Syndrome Critical Region 1*) ; ces protéines inhibent la calcineurine ayant un rôle connu dans l'apprentissage et la mémoire chez la souris (Mansuy 2003). En 2003, Chang et ses collaborateurs ont cherché à démontrer son implication dans l'apprentissage et la mémoire chez la drosophile. Les auteurs de cette étude ont généré des mutations dans le gène *nla*. Une baisse de 50% du transcrit de ce gène entraîne une chute de mémoire. Ils purent sauver le phénotype en exprimant un transgène *nla* dans les lobes α/β des corps pédonculés, en utilisant un promoteur spécifique. De plus, dans le cadre de trisomie chez l'homme, le produit du gène *nla* est surexprimé. Lorsque l'on surexprime l'homologue chez la drosophile, on observe des défauts de mémoire olfactive, mimant ainsi le phénotype humain. De plus, ce dernier comportement est spécifique de l'état et donc d'un rôle dans la mémoire puisque l'on retrouve les mêmes effets en induisant la surexpression uniquement à l'état adulte (Chang, Shi et al., 2003).

Affecter le gène *nla* entraîne plusieurs effets sur d'autres protéines déjà connues et impliquées dans les processus mnésiques. En effet, chez les individus *nla*, les auteurs ont observé une augmentation du niveau de calcineurine, une baisse de l'activité de 50% de la PKA, et une baisse du niveau de phosphorylation de CREB. L'ensemble de ces données démontre le rôle de l'homologue de DSCR1, *nebula*, dans la mémoire olfactive chez la drosophile. Ces effets semblent également avoir lieu au niveau des lobes α/β des corps pédonculés.

Crammer (*cer*)

En 2004, l'équipe de Thomas Prémat a entrepris un crible comportemental qui suivait un 1^{er} crible d'expression. Après avoir identifié des lignées P-Gal4 dont l'expression était au moins au niveau des corps pédonculés, ils leur firent passer un crible comportemental de mémoire à long terme. Ils identifièrent une lignée dont l'élément-P était inséré entre deux gènes, et qui présentait un défaut spécifique de mémoire à long terme. Après comparaison par RT-PCRq de l'expression des 2 gènes, ils identifièrent le gène CG10460 comme étant responsable du phénotype perte de mémoire (Comas, Petit et al., 2004). *Cer* code une protéine ayant une similitude de séquence avec les régions N-terminales des cathepsines ; ces protéines sont normalement synthétisées sous forme de proenzymes avec une région amino-terminale inhibitrice. Il a donc été hypothéqué un rôle de trans-inhibiteur de cathepsine pour *Cer*. Il s'avéra à la suite d'expériences de biochimie que *Cer* inhibe les cathepsines L et B *in vitro*. Ils purent par la suite sauver le phénotype par l'induction d'une copie de la région génomique de *Cer* dans l'ensemble du cerveau. Ils montrèrent que cette même induction dans un contexte sauvage générait des défauts de mémoire à long terme. Cet effet n'est pas dû à un rôle dans les corps pédonculés mais plutôt dans les cellules gliales. Cependant, il est difficile de conclure quant à un effet sur le développement des cellules gliales ou plutôt une perturbation de la physiologie permettant la mise en place de la mémoire à long terme. Néanmoins, le niveau d'expression de *cer* diminue trois heures après un conditionnement espacé. La mise en évidence du rôle de *cer* dans la mémoire démontre que de nombreux autres acteurs cellulaires et moléculaires sont impliqués dans la MLT.

Les synapsines

Les synapsines sont des protéines associées à des vésicules synaptiques et à des phosphoprotéines et qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions chez les vertébrés. Cela inclut l'élongation neuronale, la formation de synapse et la régulation de la libération synaptique (Ferreira and Rapoport 2002). Il existe 3 isoformes chez les vertébrés, dont chaque délétion unique entraîne un développement anormal de la plasticité synaptique. Chez la drosophile une seule de ces isoformes est présente. Son altération ne génère pas de défaut structural ou de structure synaptique, mais différents comportements semblent altérés (Godenschwege, Reisch et al., 2004). De plus les mutants *syn* présentent une meilleure tolérance à l'éthanol, ce qui est un phénotype observé chez de nombreux mutants de la voie de l'AMPC. Ces mutants présentent également un défaut de mémoire à 3min, suggérant ainsi que la plasticité est régulée en partie au niveau de la libération des neurotransmetteurs.

S6KII

Les kinases ribosomales S6 sont une famille protéique impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la synthèse protéique, ou la survie cellulaire. Ils sont également impliqués dans des mécanismes de plasticité synaptique et de comportement nécessitant la voie ERK/MAPK (Frodin and Gammeltoft 1999; Impey, Obrietan et al., 1999). S6KII est un membre de cette famille. Au cours d'un crible comportemental, (Godenschwege, Reisch et al., 2004) en 2004 ont isolé S6KII comme un gène important pour l'apprentissage. En effet, lorsque ce gène est muté les drosophiles présentent de faibles performances d'apprentissage après un cycle.

Latheo (*lat*)

Latheo (lat) a été le premier mutant isolé suite à une mutagenèse à l'élément P sur un crible comportemental (Boynton and Tully 1992). Il n'a été caractérisé que quelques années plus tard et code un composant du complexe de reconnaissance des origines de réplication (Pinto, Quintana et al., 1999). Les mutants *lat* présentent des défauts structuraux. Ainsi les corps pédonculés apparaissent plus petits, ce qui laisse à penser qu'il s'agit de défaut de développement. La protéine *lat* a été mise en évidence au niveau des synapses des moteurs neurones, ce qui peut expliquer les défauts de transmission synaptiques et de plasticité observés au niveau de la jonction neuromusculaire (Rohrbough, Pinto et al., 1999). Le rôle

d'un composant de reconnaissance des origines de réplication est encore obscur actuellement, et le mécanisme qui exerce un effet sur le fonctionnement des synapses reste encore à découvrir.

Linotte (lio)

Linotte est également un autre mutant identifié à partir d'un crible comportemental suite à une mutagenèse à l'élément-P (Dura, Preat et al., 1993). *Lio* code un allèle du récepteur tyrosine-kinase *derailed* (Moreau-Fauvarque, Taillebourg et al., 1998; Simon, Boquet et al., 1998). Des défauts développementaux ont été observés au niveau des corps pédonculés, qui peuvent être sauvés par l'induction du récepteur tyrosine-kinase.

Tequila (teq)

Certains retards mentaux non syndromiques sont associés à des mutations au niveau de gène codant la neurotrypsine (Molinari, Rio et al., 2002). Une importante question était de savoir si le retard mental observé était du à un défaut de développement du cerveau ou bien était la conséquence d'un défaut de plasticité synaptique. Pour répondre à cette question, les chercheurs ont utilisé l'homologie homme/drosophile pour ce qui est des gènes de la neurotrypsine, et ainsi profité des outils génétiques que cet organisme modèle propose. L'homologue drosophilien de la neurotrypsine est une sérine protéase, codée par le gène *teq*. Un mutant constitutif pour ce gène présente des défauts de MLT uniquement. Pour répondre à la question, est-ce que le retard mental observé chez l'homme était-il du ou non à un défaut de développement, les chercheurs de l'équipe de Thomas Preat ont construit un RNAi spécifiquement dirigé contre le gène *Teq* au niveau des corps pédonculés et uniquement à l'état adulte en utilisant le système Gene Switch. Dans ce contexte, les mémoires à court et moyen terme sont normales, alors que la MLT est abolie. *Teq* est donc requis pour la mise de la mémoire à l'état adulte. De plus grâce à des expériences de RT-PCRq, sur des mouches conditionnées, les chercheurs ont pu observer la variation d'expression du gène *teq* après conditionnement. La quantité d'RNAm de *teq* augmente d'un facteur 30, 4h après conditionnement. Enfin, inhiber l'expression de *Teq* avant l'apprentissage est sans effet sur la mémoire, ce qui montre que le défaut de MLT est réversible si *Teq* est naturellement exprimé *de novo* après une extinction artificielle (Didelot, Molinari et al., 2006).

Grâce à l'identification de ces gènes, un modèle de formation de la mémoire olfactive est proposé, et présenté sur le schéma 10.

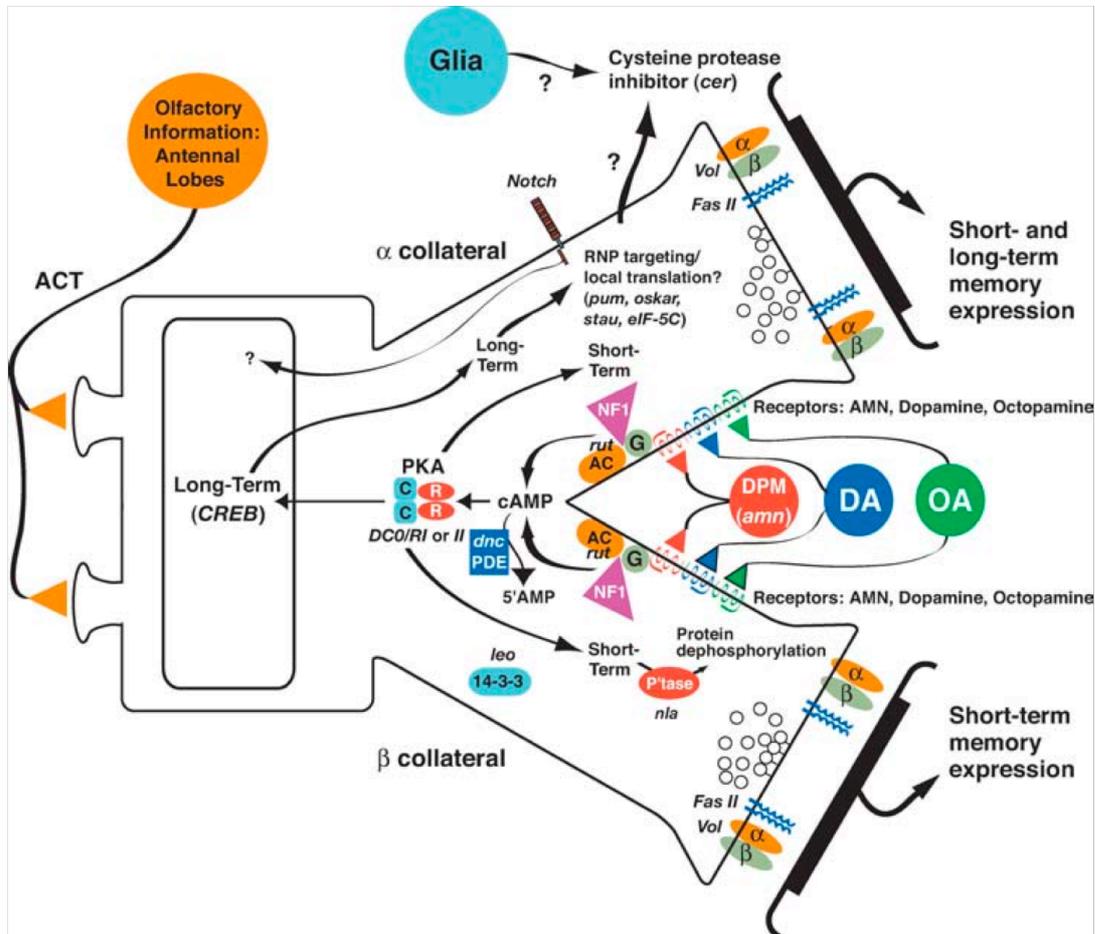


Figure 10 : Modèle cellulaire et moléculaire de formation de la mémoire olfactive chez la drosophile

Les informations olfactives, ou stimulus conditionné, sont transmises depuis les lobes antennaires aux corps pédonculés via les neurones de projections. Le stimulus de renforcement est projeté sur les corps pédonculés via les neurones dopaminergiques. La coïncidence de ces événements est détectée de manière synergique par l'activation de Rut, grâce à des protéines G via NF1, et des influx calciques qui génèrent une augmentation de cAMP dans la cellule. La modulation du taux de cAMP par Dnc entraîne ou non l'activation de la PKA, qui phosphoryle un certain nombre de substrats impliqués dans la MCT. La modulation des taux de phosphorylation par Neb est importante pour la MCT, ainsi que les protéines FasII, Vol, ou encore Leo. Le passage de la MCT vers la MTM nécessite un signal persistant de Amn depuis les DPM. La formation de la MRA implique Rsh dont le circuit n'est pas encore connu. Un certain niveau de phosphorylation de la PKA conduit à une translocation de cette dernière dans le noyau, ce qui conduit à l'activation de CREB. Il y a alors expression de gène et translocation d'RNAm via Stau et Oskar. Enfin il peut y avoir remodelage des connexions synaptiques par Cer (Davis 2005).

VII Acquisition, stockage, restitution et dynamique des phases de mémoire

a- Les lobes antennaires apparaissent comme étant le premier site de d'intégration de l'information

En 2004, Yu et ses collègues (Yu, Ponomarev et al., 2004) ont conditionné des mouches transgéniques exprimant la synapto-pHluorin au niveau des PN pour pouvoir observer les conséquences de l'apprentissage sur l'activité du cerveau. Ils ont placé ces mouches en contention dans un cône de pipette, puis ils ont retiré la cuticule, et placé l'animal vivant, le crâne ouvert, sous un microscope confocal pour pouvoir ainsi observer l'activité de la pHluorin *in vivo* (Ng, Roorda et al., 2002). Ils ont ensuite présenté de manière simultanée ou non l'odeur octanol et les chocs électriques. Puis ils représentent de nouveau l'octanol, et enregistrent les variations d'activité en fonction du protocole utilisé. Ils ont pu ainsi quantifier le relargage synaptique de ces neurones PN au niveau des glomérules des lobes antennaires avant et après conditionnement. Chez des mouches naïves, les odeurs sont représentées par la stimulation de différents groupes de PN qui projettent sur les glomérules. Chez les mouches conditionnées, les odeurs sont également représentées par les mêmes groupes de PN, mais auxquels s'ajoutent d'autres PN. Le conditionnement, qui abouti normalement à un apprentissage, semble ainsi recruter d'autres activités synaptiques de PN qui ne répondent initialement pas au conditionnement (choc+odeur). La représentation de ce CS induit des changements synaptiques qui sont plutôt d'ordre quantitatif que qualitatif. Cette trace mnésique a une très courte durée de vie de 5 à 7min et pourrait représenter la MCT.

Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus il y a plus de 20 ans par Erber et Menzel en 1980 (Erber et al., 1980). Grâce à une sonde froide, ils ont réussi à inactiver certaines régions du cerveau de l'abeille après un conditionnement, induisant un réflexe d'extension du proboscis. Une amnésie partielle est générée si les lobes antennaires sont inactivés dans une fenêtre de 3min après conditionnement.

b- Les corps pédonculés sont le site majeur de la formation de la mémoire olfactive

Il y a une accumulation d'évidences directes qui soutiennent l'idée que les corps pédonculés ont un rôle majeur dans la mémoire olfactive. Depuis les expériences avec l'hydroxy-urée de De Belle et Heisenberg en 1994 (de Belle and Heisenberg 1994), de nombreuses autres équipes ont essayé d'aller plus en détails pour comprendre leur rôle exact dans la formation de la mémoire. Pour déterminer l'importance des neurones des corps pédonculés, Dubnau et ses collaborateurs, ainsi que les équipes de Ron Davis et de Tim Tully, ont utilisé un transgène thermosensible *Shi^{ts}* (McGuire, Le et al., 2003). Celui-ci permet de bloquer au moment désiré, grâce à un passage à 30°C, les transmissions synaptiques des neurones sous le contrôle d'un promoteur. Il est alors possible de bloquer ces neurones, soit pendant l'acquisition, soit pendant le stockage, soit pendant la restitution de l'information.

Lorsque des mouches exprimant ce transgène au niveau des corps pédonculés sont entraînées puis testées à température restrictive, la formation de la mémoire olfactive est bloquée. Par contre si ce blocage intervient seulement durant l'apprentissage, ou durant l'étape de consolidation, et plus au cours de l'étape de restitution (le test), les mouches exprimant le promoteur et le transgène ne présentent pas des scores différents de ceux des contrôles. Par contre, si les neurones de sortie des corps pédonculés sont bloqués au moment du test, une chute significative est observée comme présenté sur la figure 11 (Dubnau, Graby et al., 2001 ; McGuire, Le et al., 2001). La transmission synaptique depuis les CPs est donc nécessaire pour la restitution. De plus comme le blocage des neurones durant le conditionnement ou la consolidation n'affecte pas les scores de mémoire, on peut considérer que ces mêmes neurones de sortie ne sont pas nécessaires durant ces étapes. Il ne semble à priori pas y avoir de boucle retour sur ces neurones. Enfin, pour spécifier quels sont les lobes importants dans l'acquisition de l'information olfactive, le transgène *Shi^{ts}* a été conduit seulement dans les neurones α/β . Les résultats sont identiques à ceux observés lorsque *Shi^{ts}* est exprimé dans tous les neurones des corps pédonculés. A la lumière de ces résultats il semble que l'information soit stockée dans ces lobes.

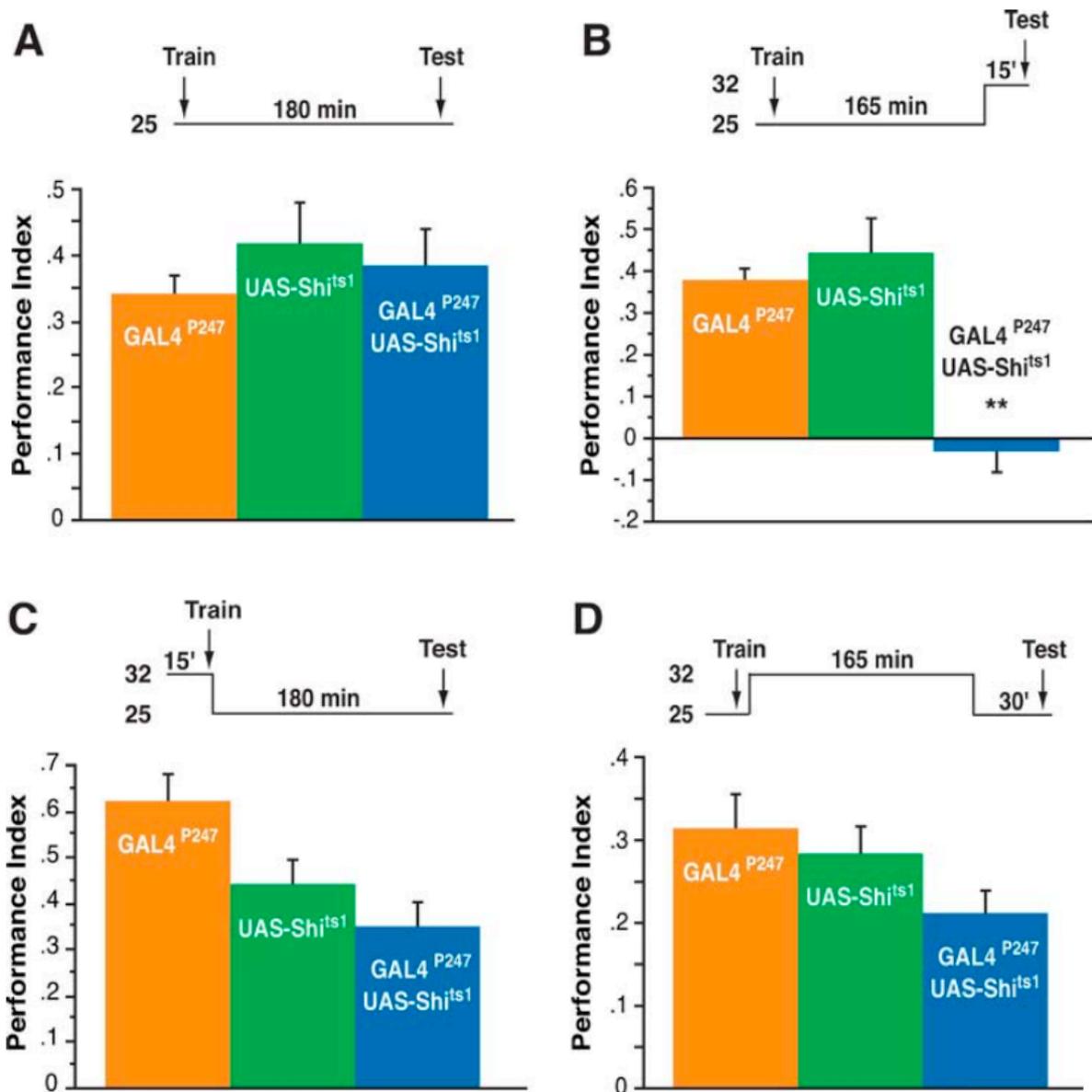


Figure 11 : Effet du blocage synaptique de la sortie des corps pédonculés sur la mémoire olfactive.

Étude de la mémoire à 3h chez des individus portant soit le transposon Gal4 p247 spécifique des MB, soit l'UAS-Shi^{ts}, soit les deux. A : à 25°C aucune différence à température permissive. B : bloquer les sorties des MB au moment du test entraîne une chute significative de la mémoire. C : conditionner uniquement à une température restrictive n'entraîne pas une chute de mémoire significativement différente des contrôles. D : placer les individus entraînés dans des conditions de température permissive, puis les placer à une température restrictive, ne génère pas non plus de chute de mémoire significative. Ainsi la transmission synaptique depuis les corps pédonculés est nécessaire pour la restitution. Adaptés de McGuire 2003 (McGuire, Le et al., 2003).

Enfin, en 2007, une étude menée Scott Waddell a montré l'utilisation séquentielle des différents lobes dans la mémoire (Krashes, M. J., A. C. Keene, et al., 2007). Pour cela il a conduit l'expression du transgène thermosensible *Shi^{ts}* des les différents lobes en utilisant des promoteurs spécifiques de certains lobes. Les résultats sont présentés figure 12.

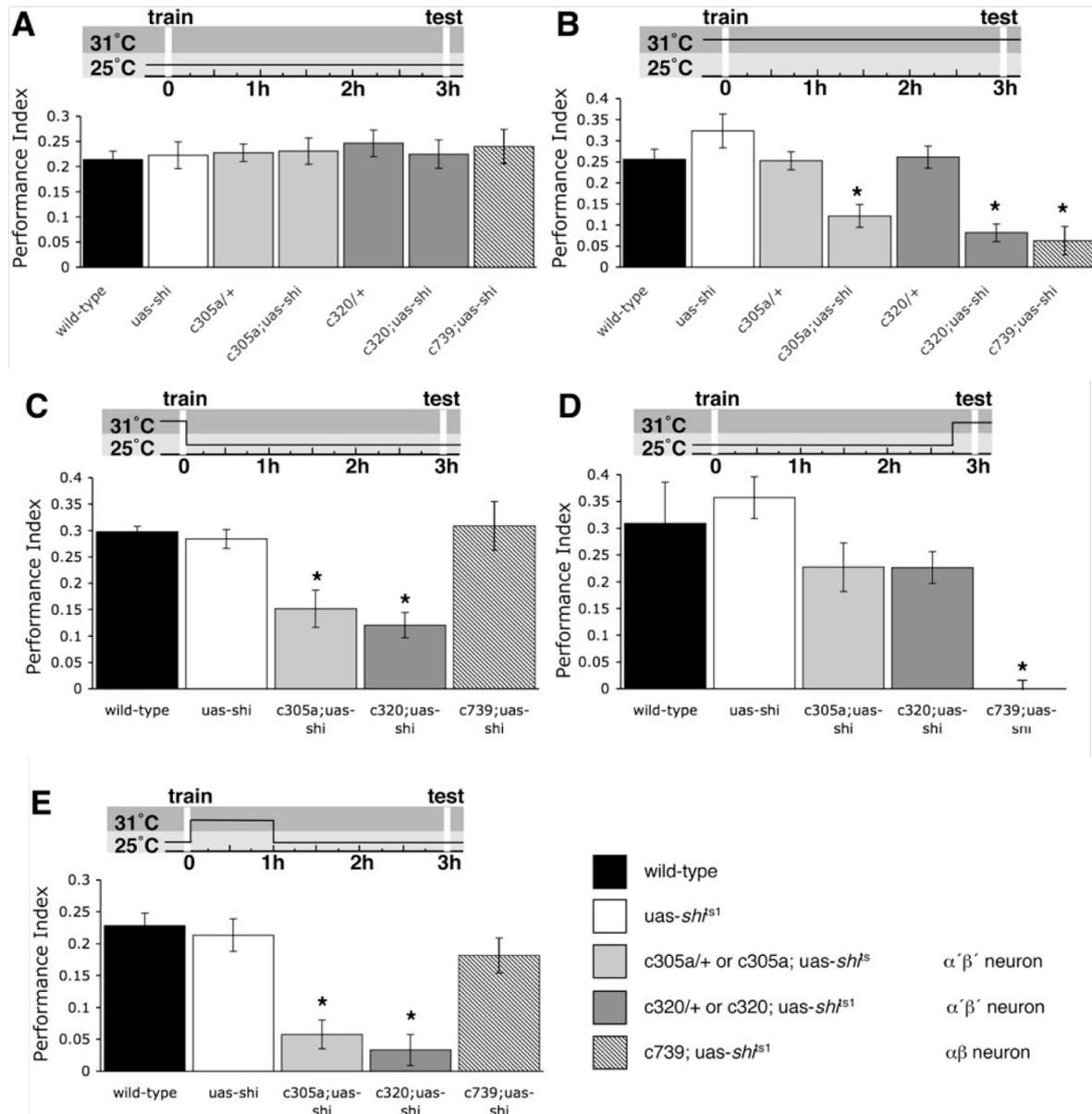


Figure 12 : La sortie des neurones α'/β' est requise pour l'acquisition et la consolidation de la mémoire aversive.

(A) à température permissive toutes les constructions présentent les mêmes capacités de mémoire 3heures après un conditionnement. (B) bloquer les neurones a/b ou a'/b' tout au long de l'expérience abolit les capacités mnésiques. (C) bloquer les neurones a'/b' pendant l'apprentissage abolit la mémoire ce qui n'est pas le cas des neurones a/b. (D) Pour la restitution, par contre les neurones a/b sont nécessaires ce qui n'est pas le cas des neurones a'/b'. (E) Les neurones a'/b' sont également nécessaire lors de la consolidation (Krashes, M. J., A. C. Keene, et al., (2007)).

Grâce à ces expériences, ils ont ainsi démontré que la neurotransmission depuis les lobes α'/β' des neurones des CPs est requise pour l'acquisition et la stabilisation de la mémoire aversive. Néanmoins ces neurones ne sont pas nécessaires pour la restitution mnésique, fonction qui est pour sa part supportée par les lobes α/β . Ces résultats suggèrent ainsi une utilisation dynamique des différents neurones.

Ainsi une première mémoire se formerait dans les lobes antennaires au niveau des neurones de projection, puis serait localisée dans les neurones des corps pédonculés qui guident les modifications du comportement. Néanmoins qu'en est-il de la mémoire à long terme, celle qui perdure plusieurs jours ? En 2001, l'équipe de Thomas Prémat, grâce à l'étude d'un mutant anatomique, a réussi à identifier les lobes responsables du stockage de la mémoire à long terme. Le mutant anatomique *alpha-lobes-absent*, ou *ala*, est un mutant structurel dont le phénotype a une pénétrance variable. Environ 10% des mouches possèdent les lobes des corps pédonculés normaux, 36% sont dépourvus de lobes β/β' , et 5% n'ont pas de lobes α/α' (Pascual and Prémat 2001). Le reste de la population présente des défauts plus asymétriques, ne touchant que l'un ou l'autre des hémisphères, ou bien des combinaisons des phénotypes déjà présentés. Ces lobes manquants ne se sont soit pas développés, soit présentent des défauts de guidage dans une autre partie du cerveau. Malgré cela, cette population hétérogène, prise dans son ensemble, présente des scores de mémoire normaux, aussi bien 3 heures après un seul cycle de conditionnement, que 24 heures après les protocoles massés ou espacés. Néanmoins, après avoir testé un groupe de mouche *ala*, si nous analysons par immunohistochimie la structure des corps pédonculés des mouches ayant fait le bon ou le mauvais choix, on observe des différences significatives entre phénotype. Les mouches n'ayant pas les lobes médians β/β' , ne présentent pas de différence avec les contrôles 24h après un conditionnement espacé, alors que celles n'ayant plus de lobes verticaux α/α' n'ont plus de mémoire à long terme. Leur score de mémoire après un conditionnement massé, ou après un seul cycle et testé 3 heures plus tard est malgré tout normal (figure 13). Cette étude a permis de montrer de manière évidente le rôle des corps pédonculés, et plus précisément des lobes verticaux, dans la formation de la mémoire olfactive à long terme. De plus comme la mémoire à court terme est normale dans ces mutants, il est possible que pour le stockage de cette information, les différents lobes aient des fonctions redondantes.

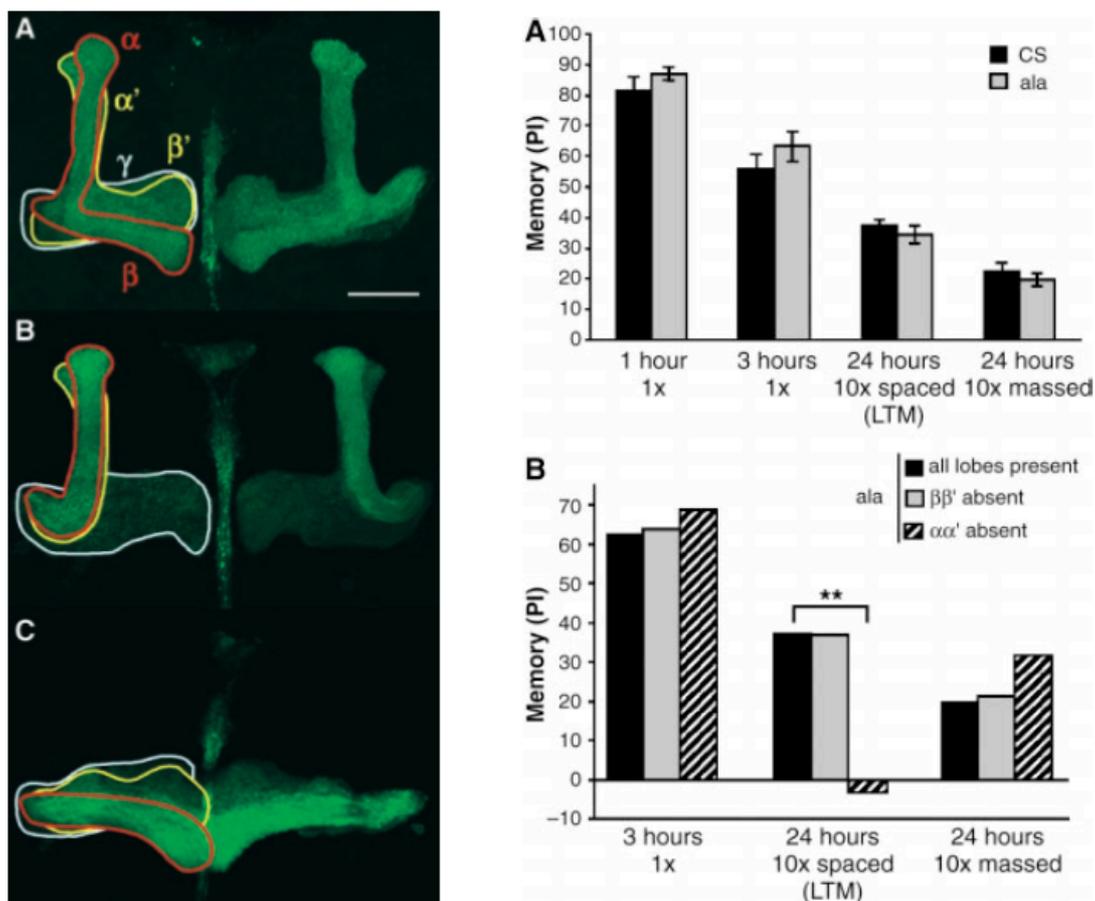


Figure 13 : Les mutants *ala* présentent des défauts spécifiques

La mémoire à long terme est abolie chez les drosophiles n'ayant plus de lobes verticaux. Les mouches *ala* ont une mémoire normale et cela quel que soit le protocole (A) ; néanmoins la sous-population n'ayant plus de lobes α/α' présente une chute significative de mémoire à long terme (B) (Pascual and Preat 2001).

Shi^{ts} s'avère un outil permettant également d'analyser les mémoires consolidées, et qui permet d'effacer les doutes de certains scientifiques issus de cette première étude. En 2004, Guillaume Isabel (Isabel, Pascual et al., 2004) , au sein de notre laboratoire, utilisa différents promoteurs pour conduire l'expression du transgène *Shi^{ts}* dans des régions précises du cerveau. La lignée 247 permet une expression dans tous les lobes, 1471 dans les lobes γ uniquement, et enfin *c739* dans les lobes α/β . Les mouches exprimant *Shi^{ts}* avec le promoteur *c739* présentent des scores de mémoire réduits de moitié par rapport aux différents contrôles dans le protocole gérant de la mémoire à long terme. Bien que celle-ci ne soit pas totalement effacée, cette expérience montre de manière évidente le rôle central de ces lobes dans le

stockage de la mémoire à long terme. De plus, après un seul cycle de conditionnement suivi d'un choc par le froid pour éliminer la mémoire labile, ce qui est mesurée 2h après est de la MRA (figure 14). Là encore les lobes α/β sont impliqués car leur blocage conduit à une chute de mémoire significative.

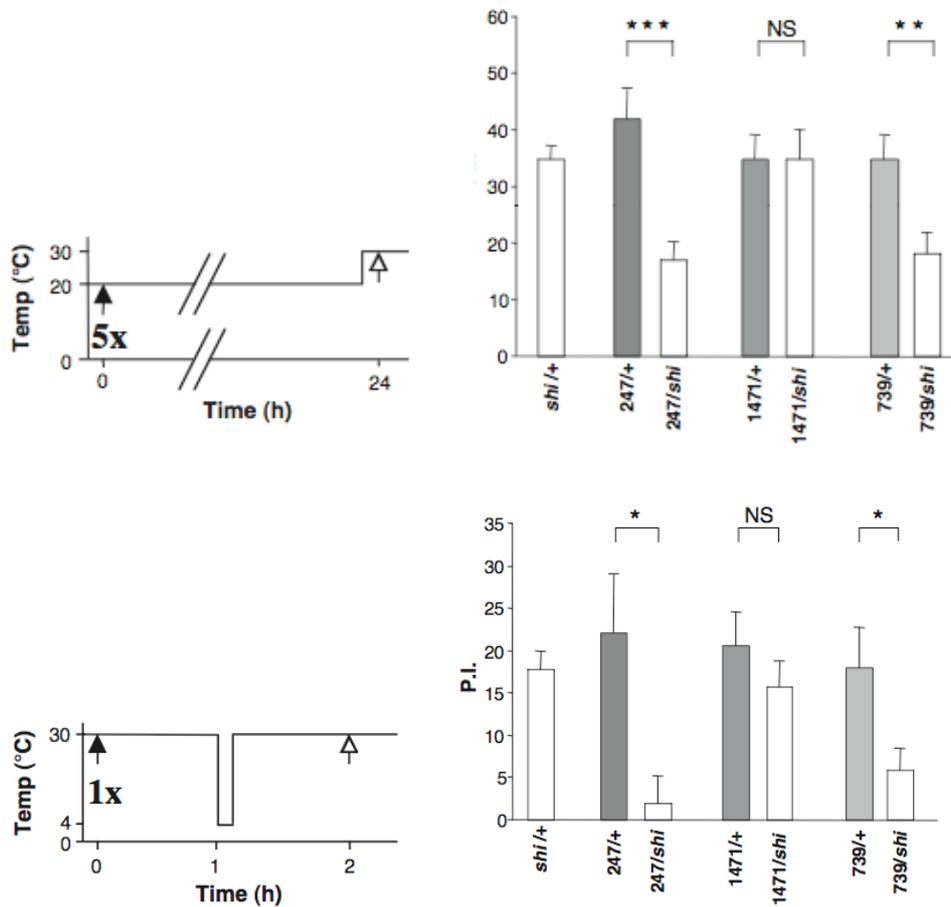


Figure 14 : Les mémoires consolidées impliquent les mêmes groupes de neurones

Le blocage des lobes α/β , lors de la restitution conduit à une chute de mémoire après conditionnement espacé. Ces lobes sont donc essentiels pour la restitution de la mémoire à long terme. La MRA dépend également des lobes α/β (Isabel et al; 2004).

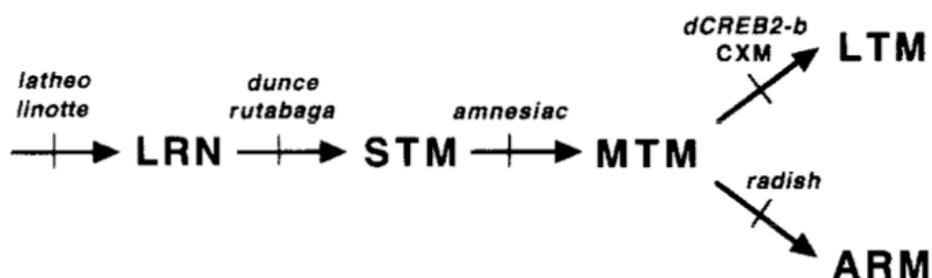
La mémoire à long terme a donc besoin d'une signalisation *via* les corps pédonculés pour qu'il y ait restitution de l'information, alors que l'acquisition ou le stockage aurait lieu en amont de la sortie des neurones des corps pédonculés (pas d'effet lorsque les neurones sont bloqués durant l'apprentissage ou la phase de consolidation (Dubnau, Grady et al., 2001; McGuire, Le et al., 2001).

c- La dynamique des phases de mémoire

Comme nous venons de le voir au cours de ces différents paragraphes et chapitres, en fonction du type de conditionnement, des mémoires aux propriétés différentes et aux multiples localisations sont générées. Néanmoins celles-ci sont liées les unes aux autres et le passage d'un type de mémoire à un autre sous-entend des mécanismes moléculaires bien précis. De plus, l'étude de pathologie humaine ou de lésions causées par divers traumatismes par le biais d'étude cognitive montre que certaines phases de mémoire sont atteintes et d'autres non. Il existe donc des juxtapositions de différentes mémoires, différentes phases qui apparaissent ou se transforment. La formation de la mémoire à long terme est d'ailleurs caractéristique car elle n'apparaît que sous certaines conditions. Les différents corrélats biochimiques et les cascades de signalisation sont par ailleurs supposés être conservés au cours de l'évolution.

Chez la drosophile un premier modèle de dynamique des phases de mémoire a été présenté en 1994 par l'équipe de Tim Tully (Tully, Preat et al., 1994). Ce modèle proposait qu'après un seul cycle ou après un conditionnement massé 3 formes de mémoire coexistaient : la mémoire à court terme, d'une faible durée de vie ; la mémoire à moyen terme qui durait quelques heures ; et enfin la mémoire résistante à l'anesthésie par le froid. Par contre la mémoire à long terme dépendante de la synthèse protéique ne se formait qu'après plusieurs cycles espacés (figure 15). À cette époque, les chercheurs supposaient que les phases de mémoire s'enchaînaient de manière linéaire. C'était également la manière la plus simple pour proposer un modèle. Grâce à l'étude des mutants *dnc*, *rut*, *rsh* et *amn* et en les soumettant à différents protocoles de conditionnement, le modèle suivant fut proposé.

Figure 15 : Modèle initial de la dynamique des phases de mémoire

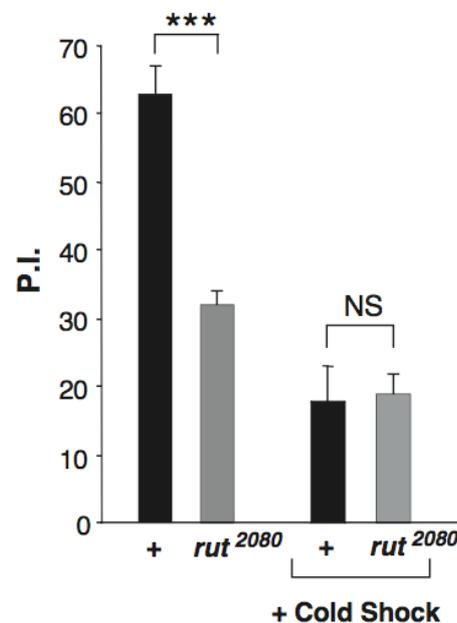


L'apprentissage est normal chez les mutants *dunc* et *rut*, mais leur mémoire à court terme est affectée. Chez les mutants *amn* la mémoire à court terme est normale, alors qu'à moyen terme il y a un défaut. Enfin, et cela en fonction du conditionnement, on génère une mémoire qui persiste dans le temps qui est soit de la mémoire résistante à l'anesthésie (pas affectée par un choc froid) abolie dans le mutant *rsh*, soit de la mémoire à long terme qui dépend de la synthèse protéique et du gène dCREB2-b.

Néanmoins ce modèle souffrait de plusieurs incohérences. Ainsi un choc par le froid est censé affecter la MRA, qui d'après le modèle présenté découle de manière linéaire du gène *rut*. Or, chez les individus *rut* soumis à un choc par le froid, la mémoire n'est pas différente des contrôles (figure 16).

Figure 16 : MRA normale chez Rutabaga

Les individus rutabaga présentent une MRA normale. Après un seul cycle de conditionnement, 2h plus tard, ceux-ci montrent un défaut de mémoire. Cette chute n'est pas le fait d'un défaut de MRA. Après un choc thermique par le froid, qui élimine la mémoire labile, 2h après un seul cycle de conditionnement, les individus CS ou *rut* présentent les mêmes scores (Isabel et al., 2004)



De la même manière, cette forme de mémoire est normale chez les mutants *amn* (Folkers, Drain et al., 1993). Le gène *amn* est supposé activer la voie métabolique de l'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase Rut. Ainsi la MRA n'est pas totalement dépendante de la MCT/MTM qui sont des voies d'apprentissage dépendantes de l'AMPc. Il y aurait donc deux voies possibles d'apprentissage. L'une qui dépendrait de l'AMPc via *dnc*, *rut* et *amn*, et une autre qui serait basée sur d'autres mécanismes moléculaires qui dépendrait de *rsh* et donnerait la MRA. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des mutations nulles concernant des enzymes de la voie métabolique de l'AMPc n'affectent pas totalement leur

mémoire immédiate (Tully and Quinn 1985). La question est ensuite de savoir si ces deux voies d'apprentissage ont lieu dans les mêmes structures du cerveau.

Pour répondre à cette question Guillaume Isabel, chercheur de l'équipe de Thomas Prémat, analysa plus en détail les capacités de mémorisation du mutants *ala*. Pour cela il les soumit à différents protocoles de conditionnement et testa leur mémoire à différents temps. Il établit ainsi une courbe de rétention en fonction de l'apprentissage chez des individus n'ayant plus leurs lobes verticaux. Bien que tous les individus présentent les mêmes capacités d'apprentissage et la même mémoire à court terme, ceux ayant subi le long protocole présentent une chute plus rapide et radicale de mémoire. Ainsi 5h après la fin du conditionnement les individus sans lobes verticaux, ayant plus appris, présentent une moins bonne mémoire que ceux n'ayant appris qu'une seule fois. Plus les individus sans lobes verticaux apprennent intensément et moins ils retiennent (figure 17).

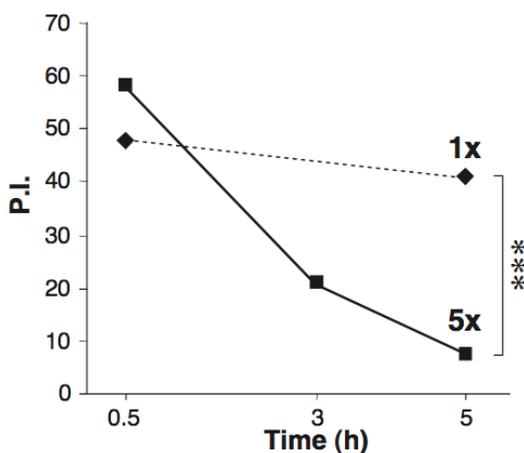


Figure 17 : Plus les individus *ala* sans lobes α/α' apprennent intensément, et moins ils retiennent

Partant du fait que 5h après un conditionnement, la mémoire mesurée est majoritairement de la MRA, et qu'après un conditionnement espacé, c'est de la MLT qui est générée, la baisse ici observée est due à un mécanisme d'effacement. Il y aurait une compétition entre MRA et MLT qui est ici mise en évidence par le fait que la MLT ne peut se stabiliser car les lobes verticaux sont absents (Isabel et al., 2004).

L'ensemble de ces données permet de proposer le modèle suivant. Il y a ainsi deux voies d'apprentissage l'une dépendante de l'AMPC l'autre étant abolie chez les mutants *rsh*. Un conditionnement espacé génère de la MLT et efface la MRA, ces mémoires consolidées étant localisées dans les mêmes groupes de neurones mais basées sur des propriétés biochimiques distinctes.

Un stimulus rencontré une fois, ou de manière répétée génère une mémoire semi stabilisée qui ne nécessite pas une cascade biochimique coûteuse en énergie, alors qu'un événement rencontré plusieurs fois de manière indépendante et répété ayant une grande

signification en terme de survie, est stocké de manière plus durable au détriment de sa rétention sous forme de MRA (figure 18).

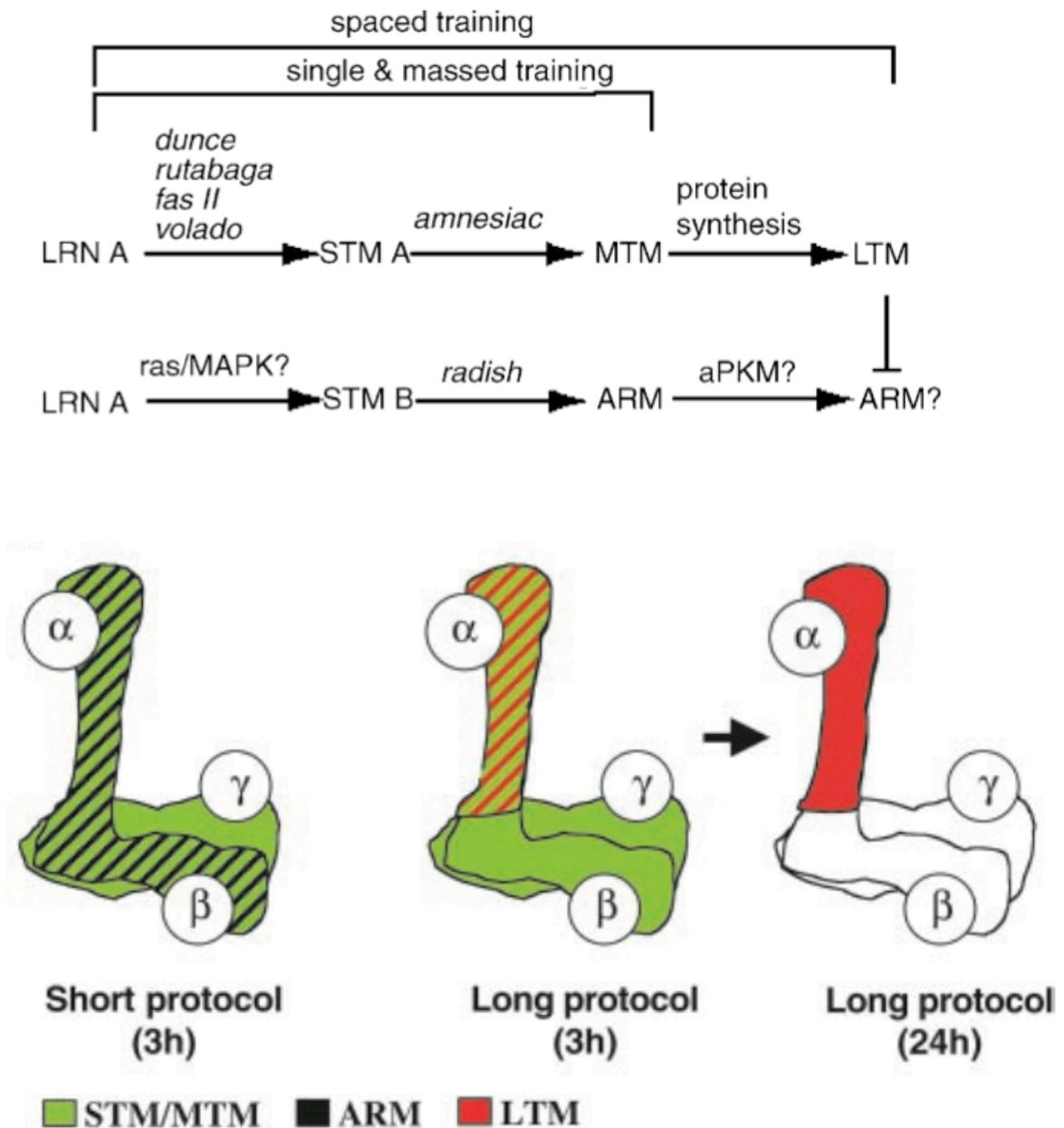


Figure 18 : Nouveau modèle de dynamique des phases de mémoire

Modèle de compétition de phase d'après Isabel et al., (Isabel, Pascual et al., 2004). Après un un seul cycle de conditionnement, MRA et MCT coexistent dans les lobes $\alpha/\beta/\gamma$. Après un protocole espacé, à 3h la MLT prend la place de la MRA dans les lobes α , avec ce qui reste de MCT dans les lobes $\alpha/\beta/\gamma$. 24h après un protocole espacé il ne reste plus que de la MLT.

Le but de mon projet de recherche était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la MLT. Pour cela nous avons exploité la capacité de notre laboratoire à pouvoir conditionner de manière semi-automatique un grand nombre de lignées en parallèle. Nous avons alors décidé de cribler des lignées P-Gal4 présentant un patron d'expression au niveau des corps pédonculés, et qui pouvait ainsi potentiellement perturber l'expression d'un gène requis dans la mise en place de la MLT. Ainsi après un premier crible portant sur cette phase de mémoire, nous avons vérifié les autres phases de mémoire, ainsi que les différentes sensibilités sous-jacentes à ce protocole. Une fois la caractérisation comportementale effectuée, nous nous sommes concentrés sur la biologie moléculaire de ce(s) gène(s). Nous avons identifié ainsi le site d'insertion du transposon par une PCR-Rescue. Puis nous avons confirmé l'implication de ce(s) gène(s), en utilisant les techniques de RNAi inductibles. Le but de ce travail est donc d'étoffer les connaissances sur la mise en place de la MLT, découvrir de nouvelles voies métaboliques impliquées dans ce type de mémoire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A Elevage des mouches

Les drosophiles sont conservées dans des étuves régulées à 18°C, sur un milieu agar-maïs-levure. L'humidité y est régulée aux alentours de 70%.

Notre souche référence à la base de nos expériences de comportement est la souche sauvage Canton-Special ou CS. Afin de s'affranchir d'un effet dû à une différence de fond génétique, toute mutation étudiée est replacée dans un contexte génétique CS. Ainsi, les variations de phénotype observées ne pourront pas être imputées aux différences de fond génétique, mais bien à la présence de telle ou telle mutation.

Lors d'expérience de transgénèse, la souche utilisée dans laquelle nous effectuons nos injections est la souche w^{1118} , qui bien qu'ayant les yeux blancs, possèdent le même fond génétique que nos CS.

B Biologie Moléculaire

I La PCR-Rescue

Si une lignée mutée de drosophile présente un phénotype intéressant du fait de l'insertion d'un transposon, l'une des premières questions à se poser est de savoir où est inséré ce transposon et quel(s) gène(s) affecte t'il ? Le protocole qui consiste à identifier le site d'insertion d'un transposon, et que nous avons utilisé est la PCR-rescue. Elle consiste à extraire l'ADN total de la drosophile et à le couper en petits fragments grâce à des enzymes de restriction reconnaissant des sites de 4 paires de base. De nombreux fragments sont ainsi générés. Cet ensemble de fragment d'ADN est alors placé dans un grand volume, en présence d'une ligase. Ainsi chaque fragment se refermera sur lui-même, et non avec d'autres. Une PCR est ensuite effectuée en utilisant comme oligos des séquences spécifiques du transposon. La séquence amplifiée, en plus de contenir une partie du transposon, correspond à la région adjacente au site d'insertion. Grâce au séquençage total du génome de la drosophile, il est aisé de retrouver quels sont les gènes potentiellement affectés par l'agent mutagène.

1. Extraction d'ADN pour PCR-Rescue

Une trentaine de mouches sont nécessaires pour ce protocole. Après avoir été endormies et placées dans un tube Eppendorf, elles sont maintenues au moins 30min à -80°C. Elles sont ensuite écrasées dans 400µl de buffer d'extraction (Tris-HCl 100mM ph=7,5, EDTA=100mM, NaCl=100mM, SDS 0,5%). Ce broyat est placé 30 minutes à 65°C. On rajoute 800µl d'une solution de LiCl/KAc (1 volume de Kac 5M, et 2,5 volume de LiCl 6M) et on incube sur la glace pendant 10min. La solution est ensuite centrifugée pendant 15min à température ambiante. On obtient alors une solution avec 3 phases : un culot protéique et de débris cellulaires, une couche lipidique à la surface, et une solution aqueuse contenant l'ADN. C'est donc le millilitre de supernageant qui est récupéré auquel on ajoute 600µl d'isopropanol pour le faire précipiter. Puis l'ADN est nettoyé avec de l'éthanol à 70%, et resuspendu dans 150µl de TE (Tris-EDTA).

2. Digestion de l'ADN total pour PCR-Rescue

10µl d'ADN sont placés dans un tube Eppendorf en présence d'une des endonucléases de restriction suivante : Sau3A I, Msp I, HinP1 I, pour un volume de réaction de 20µl. Après digestion, l'enzyme de restriction est inactivée par chauffage.

3. Ligation pour PCR-Rescue

10µl d'ADN génomique digéré sont placés dans un volume final de 400µl en présence de ligase. L'ensemble est placé à 18°C toute la nuit. L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol sur de la glace, puis séché avec le Speed Vac, et resuspendu dans 150µl TE.

On obtient ainsi la matrice des expériences de PCR.

4. PCR pour PCR-Rescue

Elle est effectuée dans un volume final de 50µl en utilisant 10µl de matrice, 5 µl de tampon 10X (soit 1X final), 3µl de MgCl₂ à 25mM (soit 1,5mM final), 1µl de dNTP 10mM (soit 0,2mM final pour chaque nucléotide, et 0,5µl de Taq polymérase (5u/µl soit 2,5u au final).

- 1^{er} jeu

PGawB-Upp : gatggcttgccttctctgaaaacggaccc

PGawB-Low : cccgtcgatagccgaagctagcttaccgaag

Si un produit d'amplification n'apparaît pas, il est possible d'effectuer, après avoir nettoyé le produit de la réaction, une seconde PCR en utilisant un jeu d'oligo plus interne par rapport au précédent. On amplifie ainsi un produit d'amplification faiblement amplifié.

- 2^{ème} jeu

oligo-interne : ccgcacacaaccttctctctcaa

1095 NES : gggttcttggcgacggttct

Si aucun produit n'est obtenu, la PCR-Rescue est à recommencer depuis le début. Par contre, si on observe un produit d'amplification celui-ci est cloné dans le vecteur pGEM-Teasy de Promega, selon les instructions du kit. Il est ensuite envoyé à séquencer.

II Extraction d'ADN pour amplifier des fragments d'ADN

Une mouche du génotype d'insert est placée endormie dans une tube Eppendorf. Elle est ensuite écrasée dans un tampon d'homogénéisation (Tris-HCl 10mM pH=8,2, EDTA=1mM, NaCl=25mM, Protéinase K= 200mg/mL) pendant quelques instants. Le broyat est alors placé 2 heures dans une étuve à 37°C. Puis la protéinase K est inactivée en chauffant l'ensemble à 95°C pendant 2 min. Cette préparation peut alors être conservée pendant 1 mois à 4°C. Pour effectuer une PCR dans un volume de réaction de 50µl, 5µl sont suffisants.

III Construction des lignées pUAS-RNAi

1. Principe du RNAi

L'introduction dans une cellule d'un ARN double brin permet de mettre sous silence l'expression d'un gène ciblé. Cette action est extrêmement spécifique et intervient de manière post-transcriptionnelle. Ce mécanisme fonctionne dans un très nombre d'organismes et se révèle être un outil très puissant (Hammond, Caudy et al., 2001). En effet, en 2006, plus de 14000 articles scientifiques faisaient référence à cette technique d'interférence ARN, montrant l'extraordinaire intérêt que les chercheurs lui portent. L'utilisation de siRNA pour étudier la fonction d'un gène chez les mammifères est devenue en très peu d'années une technique de base, utilisée par des biologistes de toutes disciplines

Les ARN double-brins présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par une ribonucléase de type III appelée Dicer. Celle-ci clive l'ARN double brin toutes les 21 à 25 paires de bases. Dicer transfère alors les siRNA vers un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Un des brins du siRNA, dit passager ou sens, est éliminé tandis que l'autre dirige le complexe RISC vers les RNAm possédant une séquence complémentaire au brin guide. Si la complémentarité entre le siRNA et l'RNAm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'RNAm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage. Ce mécanisme est donc très spécifique de la séquence du siRNA et de sa cible, l'RNAm. Dans certains cas, on peut choisir un siRNA capable de cliver un RNAm porteur d'une mutation ponctuelle sans affecter l'RNAm sauvage. Le fonctionnement est représenté figure 19.

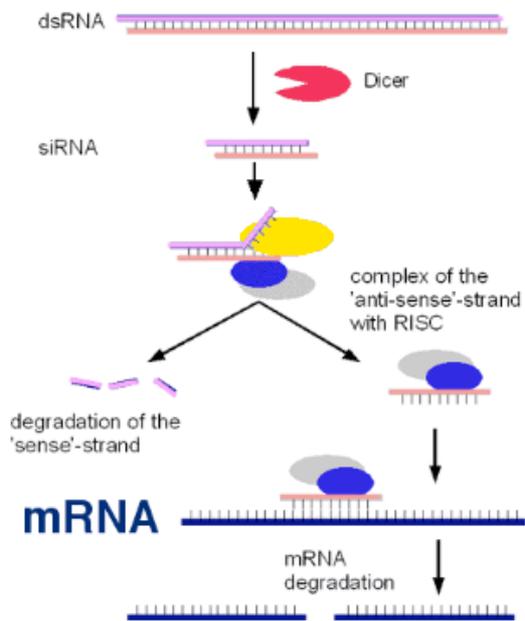


Figure 19: Représentation schématique du mécanisme du RNAi

Les fragments d'ARNdb sont coupés par Dicer pour former les fragments de siRNA. Ces fragments sont ensuite incorporés au complexe multiprotéique RISC. Le brin sens de l'ARNdb est dégradé, laissant le brin antisens guidé le complexe jusqu'à la séquence complémentaire pour effectuer le clivage.

2. Technique de construction du RNAi

L'un des problèmes dans l'injection d'ARNdb chez des embryons de drosophile est que bien que l'extinction du gène soit efficace, celle-ci est transitoire et ne se transmet pas à la descendance. Pour contourner ce problème l'équipe du Pr. Richard Carthew a développé une technique profitant des progrès de la biologie moléculaire et de transgénèse chez la drosophile (Lee and Carthew 2003). Pour exprimer de manière stable un ARNdb, des séquences répétées inversées sont placées en aval d'un promoteur et espacées par un intron, permettant de reproduire la structure en épingle à cheveux caractéristique des ARNdb. Ainsi en croisant une lignée portant cette construction inversée-répétée avec une lignée portant un pilote d'expression, le RNAi s'exprimera dans la descendance en fonction du pilote d'expression (figure 20).

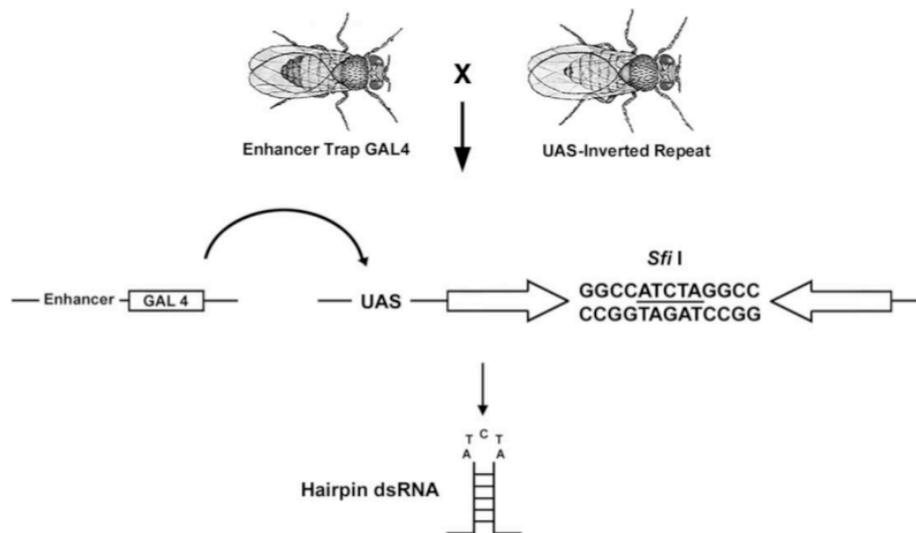


Figure 20 : Principe génétique de l'activation des RNAi

La séquence inversée-répétée est placée en aval d'une séquence UAS. Quand une lignée UAS est croisée avec une lignée ayant un pilote d'expression Gal4, la descendance F1 est hétérozygote et contient les deux constructions, l'UAS et le Gal4. Ainsi l'expression « tissu-spécifique » de cette séquence permet d'induire le RNAi chez la drosophile.

3. Construction de la séquence inversée-répétée

L'avantage de ce protocole vient du fait qu'il est facile d'insérer les différents fragments du fait de la complémentarité de certains sites de restriction. Le vecteur utilisé pWIZ dérive du vecteur pUAS. Il contient au milieu du multisite de clonage (MSC) une séquence espaceur avec de part et d'autre des sites de restriction *AvrII* et *NheI* (figure 21).

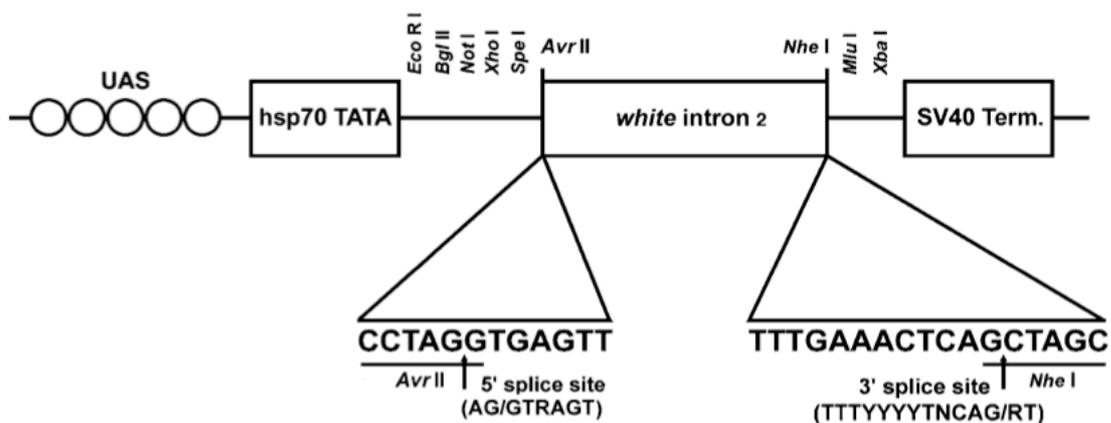


Figure 21 : Représentation du MSC dans le vecteur pWIZ

De part et d'autre du MSC existant chez le vecteur puas, un espaceur qui correspond à un intron du gène white et d'une taille de 71pb est présent pour pouvoir faire la boucle.

On amplifie à partir du génome une séquence spécifique de la cible. On utilise pour cela des oligos ayant des sites de restriction *Xba*I aux extrémités. Ce fragment est ensuite cloné dans le vecteur pGEM-T (promega) selon les instructions données. Le clone est alors séquencé. Le fragment d'intérêt est extrait du plasmide par une digestion *Xba*I puis purifié après migration. On ouvre le vecteur pWIZ avec *Avr*II. Les sites de restriction *Avr*II et *Nhe*I sont compatibles avec les sites de restriction *Xba*I. Le fragment nettoyé et le vecteur ouvert sont ensuite liés ensemble. Après avoir vérifié que le premier fragment s'est bien inséré dans le vecteur, il faut insérer le second. Pour cela on procède de la même manière, en ouvrant le vecteur avec l'enzyme *Nhe*I. L'explication du protocole est simplifiée sur la figure 22.

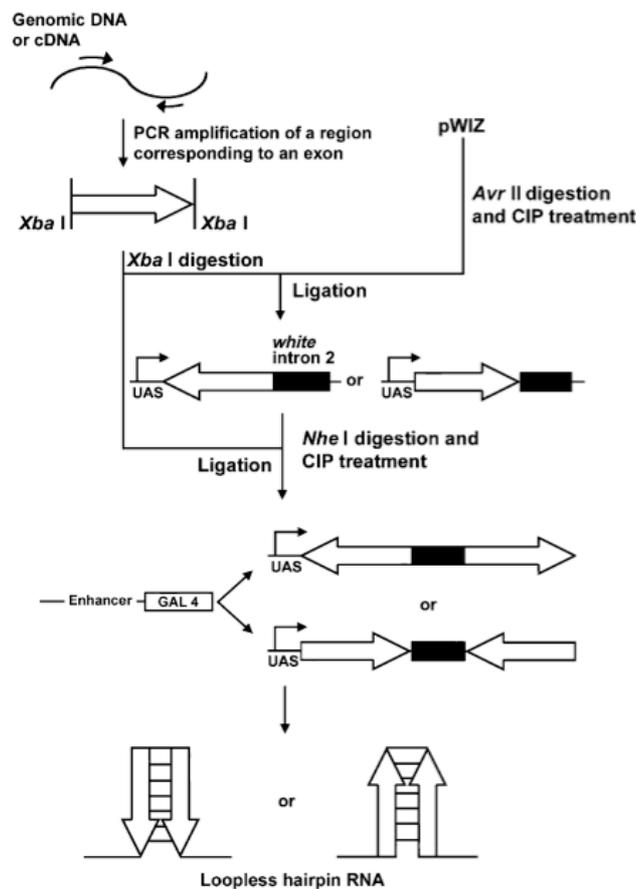


Figure 22 : Principe de construction de RNAi à partir du vecteur pWIZ

Un fragment d'ADN génomique est amplifié par des oligos ayant des sites de restriction *Xba*I à leur extrémité. Après avoir ouvert le vecteur via *Avr*II, on y insère un premier fragment. Après ligation, on ouvre de nouveau ce vecteur avec *Nhe*I, et on insère un second fragment. Par digestion enzymatique, on vérifie les sens d'insertion des inserts pour obtenir une séquence inversée-répetée.

4. Choix des oligos

a. CG11371 :559pb

3'CG11371
cgctagtctagaCCTGTCCGGTACGCATGGCTTT
XbaI
5'CG11371
cgctagtctagaCCACGTGCCGGAGTCCGAAA
XbaI

- CG31191 : 773pb

31191-for-RNAi
cgctagtctagagggccCCCCACCATTACCGCCCGATCA
XbaI ApaI
31191-rev-RNAi
cgctagtctagagagctcCCATGTTCCATGAGGGTCTGTAT
XbaI SacI

- CG5630 : 298pb

5630-For-RNAi2
cgctagtctagagggccGGCGTCCGTCGAACAGCATA
XbaI ApaI
5630-rev-RNAi n°3
cgctagtctagagagctcTGGTTTTGGAAGGCGTCCAG
XbaI SacI

Pour pouvoir déterminer avec plus de facilité le sens d'insertion des deux fragments, dans le cas des gènes CG31191 et CG5630, nous avons construit nos oligos en y ajoutant un site de restriction supplémentaire. Il s'agit d'un site unique situé entre le site XbaI, et la séquence du RNAi. Ainsi grâce à une double digestion nous pouvons savoir si les fragments sont insérés en sens ou anti-sens.

Une fois le sens d'insertion dans les clones vérifié, l'ADN est préparé pour la transgénèse avec le kit Midiprep de Qiagen.

5. Transgénèse

Nous envoyons nos constructions, ainsi que notre souche de référence au groupe BestGene spécialisé dans l'injection chez la drosophile.

IV Northern blot

1. Préparation des échantillons

Les extraits de RNAm étudiés sont issus de tête de mouche. Une centaine de mouches sont placées dans un tube Falcon puis plongé dans l'azote liquide pour la congélation. Grâce à l'action du vortex corps et tête sont séparés via l'utilisation de tamis. Les têtes sont alors récupérées dans un nouveau tube falcon (ou tube Eppendorf) déjà refroidi avec de l'azote liquide. Pour faire la poudre de tête de mouche, on place un mortier dans la carboglace et on le fait refroidir avec de l'azote liquide versé dans le mortier. Une fois qu'il est froid, on place les têtes dans l'azote liquide dans le mortier. On commence à broyer doucement avec le pilon une fois qu'il ne reste pas trop d'azote liquide dans le mortier. Une dizaine de têtes suffisent pour extraire $\pm 1\mu\text{g}$ d'ARN. Autour de 80 têtes pour $\pm 25\mu\text{g}$. On effectue ensuite l'extraction d'ARN grâce au Kit RNeasy Plant minikit de Qiagen. Par la suite les échantillons sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 et 280nm.

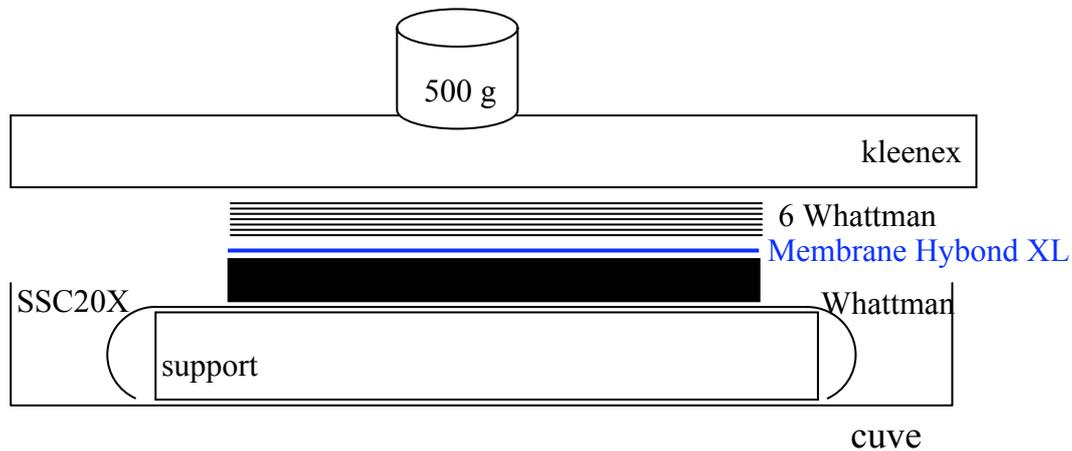
2. Migration des échantillons

Le gel d'agarose est préparé dans une cuve biorad. On utilise 1,92g d'agarose propre, 120ml d'eau milliQ, 24ml de Formaldéhyde et 16 ml de MEN 10X. Dans les échantillons préparés sont ajoutés 2-3 μl de tampon charge avec bleu de bromophenol, pour avoir un front de migration.

La migration s'effectue à 70 volts. On vérifie aux UV que la migration s'est bien déroulée.

3. Transfert

Le transfert sur une membrane de nitrocellulose Hybond N+ (Amersham) s'effectue grâce à un bain de SSC20X dans lequel trempe un papier Whatmann. Le transfert s'effectue par capillarité par les kleenex posés dessus, et est représenté dans le schéma qui suit.



Après 24h de transfert on vérifie par UV que les ARN ont bien transférés. On place la membrane 2h à 80°C avec du papier Whatman, pour accrocher les ARN à la membrane.

4. Hybridation

La membrane est mise à bloquer une heure avec le tampon d'hybridation. Ce tampon est une solution de Na_2HPO_4 (pH = 7,2) à 0,25 M (voir Sambrook et al., 1989) avec du SDS à 7% et 1mM d'EDTA. Les sondes sont dénaturées à 95°C pendant 4min. L'hybridation se fait toute la nuit à 65°C. Le lendemain les rinçages se font toujours à 65°C avec des bains de SSC de plus en plus stringent. :

- * SSC 2X , SDS 0,1%
- * SSC 1X , SDS 0,1%
- * SSC 0,5X , SDS 0,1%

Ainsi après une première hybridation, pour en faire ensuite une seconde avec une sonde contrôle, il faut soit faire « décroquer » la membrane pendant quelques jours, soit effectuer un stripping. Pour cela, nous faisons trois lavage à 65°C de 5 minutes chacun avec 1% de SDS en ébullition dans un plateau et avec un peu d'agitation sans laisser la membrane sécher. Après le troisième lavage, nous mettons directement la membrane dans une solution d'hybridation, pendant 1 heure (minimum) avant de mettre la nouvelle sonde (dénaturée).

5. Synthèse des sondes et transcription inverse

Les séquences sélectionnées s'hybrident sur l'extrémité 3' des RNAm

- Transcrit détecté pour CG5630 : 519pb
Oligo forward pour CG5630
CACAGCAAAGTTGGGGCTGCCCAA
Oligo Reverse pour CG5630
CCCTGTTTGTGGGACAGGCCTT

- Transcrit détecté pour CG31191 : 773pb
Oligo forward pour CG31191
CCCCACCATTACCGCCCGATCA
Oligo Reverse pour CG31191
CCATGTTCCCTCATGAGGGTCTGTAT

- Transcrit détecté pour CG11371: 560pb
Oligo forward pour CG11371
CCACGTGCCGGAGTCCGGAAA
Oligo Reverse pour CG11371
TTTCGGTACGCATGGCCTGTCC

Nous prenons 3µg d'ARN total que nous diluons dans 9,6 µl d'H₂O. L'ARN est ensuite dénaturé 8 minutes à 75°C, et placé 2 minutes dans un bac à glace. L'ARN est ensuite reconcentré dans le culot du tube Eppendorf grâce à un petit spin, et à nouveau placé dans le bac à glace. Nous ajoutons ensuite : 9,9µl de 2X RT mix déjà faite ; 4µl de 5X First Strand Buffer ; 2µl de Random 6mers (0.5 µg/µl) ; 2µl d'oligo RT (0,5µg/µl); 0,4µl de dNTP à 25 mM chacun ; 2µl de DTT à 0,1 M ; 1µl RNasin (Promega). Nous laissons 20 minutes à 25°C pour que l'amorce s'hybride à l'ARN. Nous ajoutons 1 µl de Super-Script Reverse Transcriptase (Invitrogen). Nous laissons incubé 60 minutes (ou selon la taille à retro-transcrire) à 45°C pour synthétiser le cDNA. Ensuite, nous le laissons 10 minutes à 75°C.

Les sondes radioactives utilisées sont élaborées en marquage aléatoire à partir du système "Readiprim H" (Amersham) sur 50 ng d'ADN en présence de 5 µCi de dCTP α³².

Après 1 heure de marquage à 37°C, la sonde est purifiée sur colonne (mini quick spin DNA columns Roche) et dénaturée pendant 5 min à 95°C avant utilisation.

V Western blot

1. Extraction des échantillons

Les extraits protéiques étudiés sont issus de tête de mouche. Une centaine de mouches sont placées dans un tube Falcon puis plongé dans l'azote liquide pour la congélation. Grâce à l'action du vortex corps et tête sont séparés via l'utilisation de tamis. Les têtes sont alors récupérées et broyées dans un tampon de lyse (saccharose 100mM, K₂HPO₄ 40mM, EDTA 30mM, KCl 50mM, Triton 0,25%, DTT 10mM, PMSF 0,5mM, CLAPS 1x). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes, à 4°C, à 10000rpm. Les protéines sont situées dans la phase aqueuse, et soit directement congelées et conservées à -20°C, soit directement utilisées après un passage à 95°C qui détruit les structures quaternaires.

2. Migration et transfert

La migration de protéine se fait via 2 gels successifs. Un gel de concentration est coulé au-dessus d'un gel de séparation permettant ainsi une entrée homogène de l'échantillon. Entre 30 et 50µg d'échantillons protéiques sont mis à migrer sur gel d'acrylamide 7,5%. À la fin de la migration, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (0,65mA/cm², Amersham).

3. Traitement de la membrane

La membrane est mise à bloquer pendant 1 à 2h dans une solution de PBS 1x/lait5%. Elle est incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS 1x/lait 5% à 4°C avec agitation. Le lendemain, la membrane est rincée 4 fois 15 minutes dans du PBS 1x/tween 20 0,05%. L'incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans PBS 1x/tween 20 0,05% dure 2 heures à température ambiante avec agitation. La membrane est rincée 4 fois 15 min dans PBS 1x/tween 20 0,05%. Elle est incubée 2 min avec les réactifs ECL (Pierce). Le signal est révélé par développement sur films ECL (Amersham).

VI RT-PCRq

La mise en place de la mémoire à long terme nécessite la synthèse *de novo* de certaines protéines. Un moyen de montrer l'implication d'un gène dans un processus est de montrer que son expression varie de manière spécifique dans ledit processus. Nous avons comparé, dans le cas d'un conditionnement espacé, l'expression des transcrits d'intérêt par rapport aux transcrits de gène de ménage, puis effectué le même rapport dans le cas d'un conditionnement ne conduisant pas à la mise en place de la mémoire à long terme. Un ratio entre ces deux rapports est ensuite fait pour pouvoir quantifier la variation du transcrit d'intérêt.

1. Principe

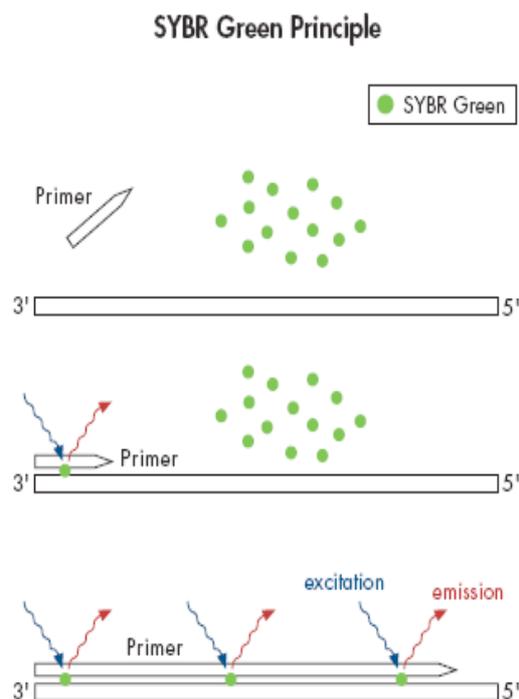


Figure 23 : Principe de la RT-PCR

Grâce aux primers spécifiques, un produit d'amplification est obtenu à partir des RNAm. Le Sybr est intercalé entre les brins et émet après excitation. L'émission est alors proportionnelle à la quantité d'RNAm présent.

A partir des brins d'RNAm isolés, nous

2. Conditionnement

procédons à des étapes d'amplification. Plus il y a de produit amplifié, plus le SYBR s'intercale entre les brins. Celui-ci émet de la fluorescence une fois intercalé. L'émission de fluorescence augmente avec les cycles de PCR (figure 23). On quantifie à chaque nouveau cycle de PCR, l'émission de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de matrice d'ADN elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ARN.

Nous comparons l'effet d'un conditionnement espacé générateur de mémoire à un traitement particulier. Il est également composé de 5 cycles espacés par 15 minutes de latence, mais les chocs électriques et les arrivées des odeurs sont décalées. Il n'y a ainsi pas d'association effectuée, et donc pas de mémoire formée. Ce conditionnement dure un tout petit peu plus longtemps que le conditionnement espacé classique (1h40 contre 1h30), mais présente les mêmes caractéristiques³.

3. Extraction d'ARN

80 à 100 mouches sont placées dans un tube Falcon et immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Les têtes sont séparées du corps après un passage au vortex (le cou se brise). L'extraction des ARN totaux des têtes de drosophile est effectuée grâce aux kits RNeasy Plant Mini Kit de chez Qiagen. La quantité et la qualité de l'extraction sont déterminées par mesure spectrophotométrique à 260nm et 280nm. Après extraction, les RNAm sont conservés à -80°C.

4. Protocole

Nous avons utilisé le kit « one step » de Qiagen. Nous avons déposé dans un capillaire 10 µl du QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix pour une concentration finale en Mg²⁺ de 4mM, et 0,2µl de QuantiTect RTmix. Ces deux tampons apportent la HotStarTaq DNA Polymerase spécifique, les dNTP nécessaires à l'élongation, ainsi que les conditions assurant l'étape de transcription et d'élongation. Les oligos sont à la concentration finale de 1mM.

La transcription inverse s'effectue à 55°C pendant 20 minutes grâce aux Omniscript®Reverse Transcriptase et Sensiscript®Reverse Transcriptase. Puis passage à l'étape de PCR en passant à 95°C. La HotStartTaq DNA Polymerase est alors activée, et l'élongation peut commencer. L'hybridation se fait à 52°C et dure 30 secondes et l'élongation à 72°C pendant également 30 secondes.

L'émission mesurée est dûe au SYBR Green, un agent intercalant. Plus il y a de

note³ : Un crible comportemental intégrant des expériences de RT-PCRq a également été effectué par le laboratoire de Tim Tully (Dubnau, Chiang et al. 2003). Dans ce cas les auteurs ont utilisé comme expérience contrôle un conditionnement massé qui génère une mémoire non dépendante de la synthèse protéique. Or ce conditionnement est composé de 5 cycles massés pouvant induire un stress important chez les individus conditionnés, et ainsi biaiser les résultats obtenus.

produit amplifié, plus le SYBR s'intercale entre les brins, et l'émission de fluorescence est importante. On quantifie à chaque nouveau cycle de PCR l'émission de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de matrice d'ADN, elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ARN.

5. Choix des oligos

Pour pouvoir correctement quantifier la quantité de transcrit, nous cherchons à amplifier une séquence spécifique de l'RNAm. Pour cela nous choisissons un couple d'oligo amplifiant un produit d'une centaine de paires de base, dont l'un des deux est à cheval sur deux exons séparés par un intron. Cet intron est représenté sur les séquences suivantes par une étoile.

- Sequence: CG 31191

CCTGGCCACCAGGCAGAGCAGCAGGACAAACAAGAGAGCCGGAAGTCTGCGGCTGGTGCTGCCACTGGACAGCGA
AGTTTCGATTCAT***CAA**CCACAAACTTCGTGGGCAAGTTCACGCAGAGTGTGCGCCGAATCGTGCAGGATGTGAAG
GACGAGGGGGCGCCAGTGAATGACG

Upper primer

5'-position : 72
Length : 19
Sequence : 5'-GCGAAGTTCGATTCATCAA-3'
3'-AACTACTTAGCTTGAAGCG-5'

Lower primer

5'-position : 149
Length : 18
Sequence : 5'-CTTCACATCCTGCACGAT-3'
3'-TAGCACGTCCTACACTTC-5'

PCR product

Position : 72 - 149
Length : 78 bp
GC% : 52,6 %

Tm(product) : 72,8 °C
Tm(annealing) : 53,7 °C

- Séquence pour CG5630

**TGCGGATTTCTCGATCTACAACCGTTCGTCTACGACTACTGCCAGGCCAATCTTTCAAATCAATGATAGTGAC
TTTG*TGACCTCGGCACCATCGTGGCGTCCGTCGAACAGCATACGCCGGCCGCCCCCACCCTCCCGTT
GTGGGACTGCCACCATGCGGCCAACGCAAGGCTGTCCACAA**

Upper primer

5'-position : 12
Length : 20
Sequence : 5'-**CGATCTACAACCGTTCGTCT**-3'
3'-TCTGCTTGCCAACATCTAGC-5'

Lower primer

5'-position : 89
Length : 18
Sequence : 5'-**GTGCCGAGGTCACAAAGT**-3'
3'-TGAAACACTGGAGCCGTG-5'

PCR product

Position : 12 - 89
Length : 78 bp
GC% : 47,4 %

Tm(product) : 70,7 °C
Tm(annealing) : 52,6 °C

- Sequence: CG 11371

**GCCCTGCTGAATCGTGGATTTAAAGCAGGAGAAGAAAAACGATTTCCCTAAAAGA*TGATAAGTGGGAGCGA
ACTGATGTTAGTTCTTCATCATCAAGAAACCGCCGAGGACGTAAATCAAAGATTGATTCCAACGTCGAGGATT
TTGGCGATGAAGAAAAAAGACTCTAGATGGGATGAAGACGATGACT**

Upper primer

5'-position : 41
Length : 20
Sequence : 5'-**CGATTTCCCTAAAAGATGAT**-3'
3'-TAGTAGAAAAATCCCTTTAGC-5'

Lower primer

5'-position : 104
Length : 18
Sequence : 5'-**CGGTTTCTTGATGATGAA**-3'
3'-**AAGTAGTAGTTCTTTGGC**-5'

PCR product

Position : 41 - 104
Length : 64 bp
GC% : 40,6 %

Tm(product) : 66,0 °C
Tm(annealing) : 47,9 °C

Les séquences utilisées pour quantifier le transcrit du gène Tubuline sont les mêmes que celles dans le cadre de l'analyse du gène crammer (Comas, Petit et al., 2004) ou de tequila (Didelot, Molinari et al., 2006).

- Tubuline

Tub Upp :

Sequence : **TTGTCGCGTGTGAAACTTC**

Tub Low:

Sequence : **CTGGACACCAGCCTGACCAAC**

Le produit PCR fait 80pb

6. Validation des expériences de RT-PCRq

Les expériences de RT-PCRq sont des expériences extrêmement sensibles. Il est donc très important d'avoir plusieurs paramètres fiables à vérifier pour valider un résultat. La dynamique d'amplification des PCR en général suit une courbe sigmoïde. Celle-ci comporte un point d'inflexion. Pour des dilutions successives d'un même échantillon, ce point d'inflexion est ainsi décalé de manière constante. On obtient alors une droite (qui est la valeur de ce point d'inflexion en fonction de la dilution) pour chaque gène étudié. Les paramètres sur lesquels nous nous sommes concentrés sont à la fois l'écart-type des quatre valeurs obtenues pour chaque droite, mais également la différence des coefficients directeurs. Les paramètres que nous avons choisis ($EC < 0,25$, et différence de coefficient directeur $< 0,6$) nous donnent des résultats qui restent dans les mêmes ordres de grandeur.

VII Comportement

1. Elevages et croisements

Les mouches sont élevées à 18°C, et sont issues de croisements constitués d'une cinquantaine de femelles pour au minimum vingt mâles. Ces croisements sont repiqués tous les trois jours pour éviter une accumulation d'individus de la descendance et la génération d'odeur de décomposition.

2. Préparation des mouches avant le conditionnement

La veille du conditionnement, une centaine de mouches à tester âgées de 24h à 3 jours sont placées dans des bouteilles contenant un mouchoir enfoncé dans le milieu, et conservées une nuit à 18°C et 50% d'humidité. Cette précaution présente l'avantage de les mettre dans un environnement neuf, et propre, limitant ainsi le contact avec un milieu humide où elles pourraient se coller. De plus la présence du mouchoir leur permet d'essuyer leurs pattes. Elles sont ensuite déplacées dans la pièce à conditionnement qui est à 25°C, 20 à 30 minutes avant le début de l'expérience.

Pour les expériences nécessitant l'utilisation du système Gene-Switch, ledit milieu est préparé le jour même. Avant que le milieu ne refroidisse et ne durcisse, il est complété avec du RU486 à la concentration finale de 200µM. Les individus sont placés dessus pendant 2 jours avant le conditionnement, et dans le cas d'étude de la mémoire 24h après apprentissage, elles sont de nouveau placées sur un milieu complété frais. Dans ce cas, nous n'utilisons pas de kleenex pour ne pas dessécher le milieu.

3. Préparation des odeurs

Les substances odorantes utilisées sont le 4-méthyl-cyclohexanol (MCH) et le 3-octanol (OCT), deux alcools naturellement répulsifs pour les mouches. Il n'y a pas aux concentrations utilisées de préférence pour l'une ou l'autre des deux odeurs. Leur préparation se fait par dilution de 58µl de MCH et de 48µl de OCT dans un volume prédéfinie d'huile de paraffine Rectapur (environ 175mL), car ces alcools sont hydrophobes. Les dilutions utilisées sont donc de 3.60×10^{-4} pour l'octanol, et de 3.25×10^{-4} pour le 4-méthyl-cyclohexanol. Les bouteilles et les tubes plongeurs sont répartis en deux lots spécifiques. Ceux qui sont réservés pour l'odeur OCT et ceux qui le sont pour l'odeur MCH. On évite ainsi des mélanges d'odeurs qui pourraient par la suite interférer sur les expériences.

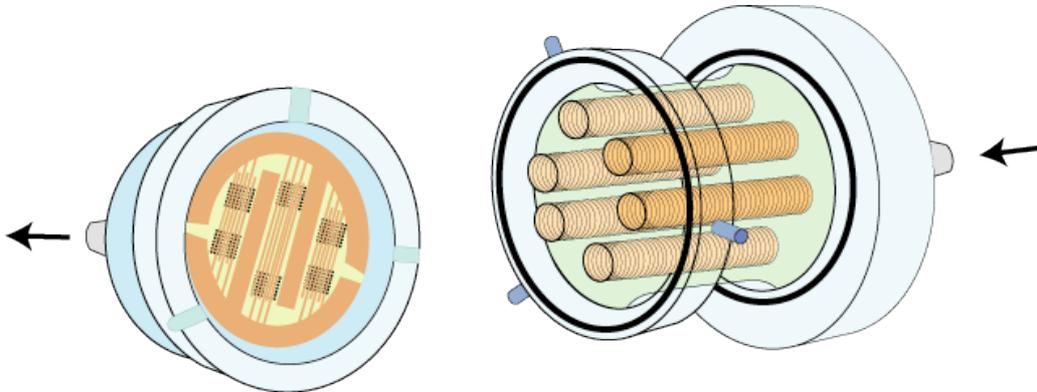
Une pompe à vide permet de faire barboter de l'air dans ces solutions et les odeurs diluées ainsi créées sont acheminées dans les chambres de conditionnement ou de test grâce à des tubes recouverts de téflon. Le débit est réglé à 2l/min pour chaque barillet pour le conditionnement (soit environ 300ml/min par chambre de conditionnement) et 800ml/min pour le test (soit environ 400ml/min par compartiment)

4. Le conditionnement pour la MLT

Il s'agit ici d'un conditionnement olfactif non opérant, de type pavlovien. Les mouches sont soumises à leur environnement et ne peuvent y échapper. Entre 50 et 100 mouches porteuses du même génotype sont enfermées dans des barillets. Chaque barillet contient 6 compartiments recouverts d'une grille électrifiable en cuivre. Le couvercle et le dos du dispositif sont également recouverts de cuivre de telle sorte que les mouches ne peuvent échapper aux chocs électriques. Après avoir vérifié qu'il y a une bonne circulation d'air et que le courant circule le long des grilles, les compartiments sont ensuite chargés à l'aide d'un pneumo-capturateur et d'une pièce circulaire laissant un seul des six compartiments ouverts. On peut ainsi charger le barillet tranquillement sans risquer de vider un compartiment précédemment rempli. Le barillet est ensuite branché sur la circulation d'air et le circuit électrique. 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. Le conditionnement peut alors commencer. Il se déroule dans une pièce hermétique à 25°C et 70% d'humidité. Ces conditions permettent à la fois une meilleure évaporation des odeurs et une meilleure conductivité électrique. Les mouches reçoivent pendant 60 secondes 12 chocs électriques d'une amplitude de 60V et d'une période de 1,25secondes en présence de la première odeur : c'est le stimulus conditionné CS+. Cette première phase est ensuite suivie d'une période de repos de 45 secondes durant laquelle l'air est nettoyé par un courant d'air neutre. Ensuite les mouches sont exposées à la seconde odeur, non associée à des chocs électriques CS-. Le cycle est répété 5 fois avec une phase de repos de 15 minutes. Ce conditionnement est représenté sur la page suivante.

Protocole de conditionnement de mémoire à long terme

Le barillet à 6 positions



De 0 à 90 sec : émission d'air

De 1min 30 à 2 min 30 : émission de la première odeur associé aux chocs électriques.

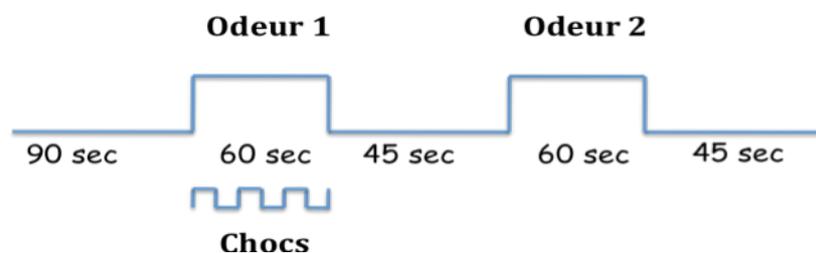
De 2 min 30 à 3 min 15 : rinçage de l'odeur avec de l'air.

De 3 min 15 à 4 min 15 : émission de la seconde odeur.

De 4 min 15 à 5 min : rinçage avec de l'air.

⇒ ce cycle est répété 5 fois avec une pause 15 minutes entre chaque cycle. On génère ainsi de la MLT.

Schéma d'un cycle de conditionnement



À la fin de la phase de conditionnement, un dispositif permet de positionner 6 tubes de nourriture en face des 6 compartiments afin de collecter les mouches conditionnées. Celles-ci sont ensuite transférées dans des bouteilles afin de leur assurer plus d'espace, et de générer le moins de stress possible. Puis ces bouteilles sont placées à 18°C et 50 % d'humidité pendant 24 heures.

On teste ensuite la rétention de ce conditionnement le lendemain grâce à une machine à test mise au point par T. Tully (Tully and Quinn 1985).

5. La phase de test de la MLT

Le test s'effectue sur des populations comprenant entre 30 et 50 individus (si possible) conditionnés. Il a lieu généralement 24h après le conditionnement. Grâce à un système coulissant, les mouches se retrouvent bloquées dans la machine à test, puis transférées dans une chambre où convergent les deux odeurs précédemment rencontrées. Elles ont alors un laps de temps défini, d'une minute exactement, pour se diriger vers l'une ou l'autre des deux odeurs. Elles se répartissent en fonction de leur préférence, influencées par leur mémoire, dans des tubes d'où proviennent les courants d'air chargés d'odeur. Au bout d'une minute on fait coulisser la partie amovible de la machine à test et on bloque ainsi leur sortie. Les mouches sont alors coincées dans les tubes où elles seront par la suite comptabilisées.

Le test se déroule dans le noir, afin que les mouches ne puissent pas être influencées par l'environnement extérieur qu'elles pourraient voir. Il se déroule dans une pièce hermétique à 25°C et 70% d'humidité, comme pour le conditionnement. Lors de cette phase, il est très important que la machine à test et les bouteilles soient bien équilibrées. Il faut alors s'assurer que les débits d'air provenant des bouteilles soient équivalents. Pour cela on diminue la pression que l'on impose, et seule la bouteille ayant le plus petit volume continue à buller car il y a moins de résistance. Une fois les débits examinés, il faut s'assurer que le système n'est pas biaisé. Pour cela on effectue un test en utilisant des mouches CS naïves, c'est-à-dire qui n'ont jamais rencontré l'une des deux odeurs. La répartition doit alors être la plus proche possible de 50/50. Si elles ont une préférence pour un côté, cela signifie qu'il faut diminuer le débit de l'odeur qu'elles ont fuie, et ce jusqu'à ce que l'on obtienne une distribution égale de chaque côté. Une fois cela vérifié, on peut faire le test sur nos mouches conditionnées.

6. Les autres phases de mémoire

Pour pouvoir tester la MCT ou la MRA, nous préparons les mouches de la même manière que pour la MLT. Les mouches sont placées la veille des conditionnements dans des bouteilles neuves et conservées une nuit à 18°C et 50% d'humidité.

Pour la MCT, les mouches subissent un seul cycle de conditionnement. Elles sont ensuite conservées dans la pièce de conditionnement pendant 2 heures, puis passent le test. Pour la MRA, les mouches subissent le cycle de conditionnement cinq fois de suite, et contrairement à la MLT, sans intervalle de 15 minutes. Les cinq cycles s'enchaînent les uns à la suite des autres, et le conditionnement ne dure pas 1h30 mais 30 min. Les mouches sont ensuite récupérées, puis transférées dans de nouvelles bouteilles et placées à 18°C avec 50% d'humidité. Le test se déroule ensuite 24 heures plus tard.

7. Importance des contrôles

Dans ce type de protocole, il est nécessaire de contrôler l'olfaction et la réactivité aux chocs électriques. En effet, une olfaction défaillante ou une insensibilité aux chocs pourrait être interprétées faussement comme un apprentissage défaillant.

Le contrôle de l'olfaction se fait en laissant des mouches naïves choisir entre une des deux odeurs ou un flux d'air pendant 1 minute. Les odeurs utilisées étant répulsives, les mouches ayant une olfaction normale choisiront le flux d'air. Mais ce protocole présente l'inconvénient que l'olfaction est testée sans chocs électriques. Or, la présence de stimuli aversifs et nocifs peut affecter certains aspects de la perception et de cette manière altérer les performances d'apprentissage et de mémoire (Préat 1998). Une nouvelle procédure de contrôle de l'olfaction a été mise au point après que les mouches aient été soumises à un choc électrique associé à une première odeur. Ensuite lors de la phase de test, la réactivité des mouches à la seconde odeur répulsive est évaluée (Préat 1998). Concrètement, les mouches subissent l'association d'une odeur avec les chocs électriques de la même manière que lors d'un conditionnement normal. Puis elles sont ensuite placées directement dans la machine à test où elles ont le choix pendant 1 minute entre un flux d'air et un flux chargé de la seconde odeur. Nous vérifions ainsi que les chocs électriques reçus ne perturbent pas l'olfaction pour la seconde odeur.

Pour contrôler la sensibilité aux chocs électriques, nous utilisons un appareillage particulier (figure 24). Deux barillets de conditionnement sont connectés l'un à l'autre par une

pièce centrale, et seulement l'un des deux barillets est traversé par un courant électrique. Les mouches sont initialement coincées dans la partie centrale, et ont ensuite 1 minute pour choisir entre les deux barillets.

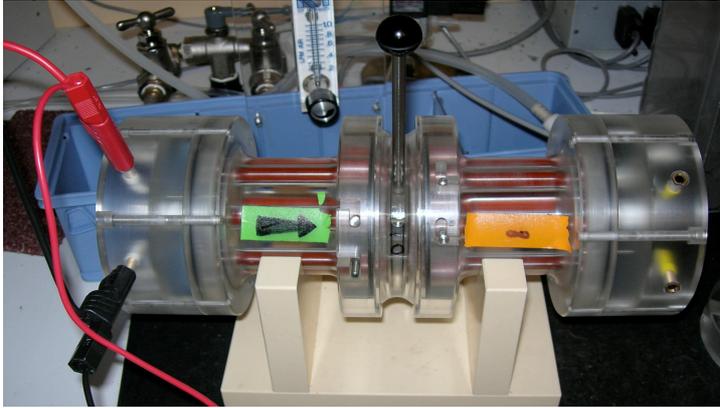


Figure 24 : dispositif pour tester la sensibilité aux chocs électriques

Avec l'étiquette verte, le barillet connecté, traversé par un courant électrique ; en orange un barillet non connecté ; entre les deux, la partie centrale où sont initialement placés les mouches.

Le contrôle de la réactivité aux chocs est effectué en laissant les mouches choisir entre deux flux d'air passant à travers deux tubes distincts, l'un des tubes étant électrifié. Dans le cas de ces deux contrôles, un indice de performance sur l'ensemble de la population est mesuré, de la même manière pour un score de mémoire.

C Histologie

1. Coupes paraffines de cerveaux adultes

Les mouches sont placées dans des colliers histologiques, fixées pendant 4 heures dans une solution de Carnoy (40mL éthanol 100%, 20mL chloroforme, 7mL acide acétique), déshydratées 2 x 30min dans de l'éthanol 100%, perméabilisées pendant 5min dans du méthylbenzoate puis incubées toute la nuit dans une nouvelle solution de méthylbenzoate. Le lendemain, pour l'inclusion, elles sont incubées dans trois bains successifs de paraffine à 65°C. Chaque bain dure une heure minimum. La paraffine du dernier bain est mise à solidifier avec les colliers à température ambiante et conservée au frigo jusqu'au moment de la coupe. Les têtes sont coupées au microtome en sections frontales de 7µm et les lames sont mises à sécher à température ambiante.

2. Immunohistochimie

Les coupes sont déparaffinées dans deux bains successifs de xylène de 30 min, puis rehydratées dans deux bains d'alcool 100% de 10 min et un bain d'éthanol 70% de 5 min. Elles sont mises ensuite à réhydrater dans deux bains de PBS1x de 5 min. Les lames sont saturées à plat avec du PBS1x/sérum de cheval 10% pendant 30 min. Les lames sont incubées en chambre humide toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS1x/sérum de cheval 10%.

Le lendemain, les lames sont rincées dans trois bains successifs de PBS1x de 5 min. L'incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans le PBS1x/sérum de cheval 10% dure deux heures à température ambiante. Les lames sont rincées dans trois bains de PBS1x de 5min. Une incubation de 30min avec un mélange avidine-biotine est faite pour amplifier le signal. Les lames sont rincées dans trois bains de PBS1x de 5min. La coloration est effectuée en présence de DAB (3,3'-diaminobenzamidine), l'évolution de la coloration est observée sous la loupe. Lorsque la coloration est correcte, la réaction est arrêtée en plongeant les lames dans un bain de PBS 1X. Les lames sont enfin montées avec du milieu de montage Dako.

D Analyse statistique

Pour nos expériences de comportement, nous analysons les groupes testés avec les groupes contrôles. L'analyse statistique se fait en utilisant le test de student. Il s'agit d'un test paramétrique qui permet de comparer les moyennes de deux échantillons statistiques (on parle alors de test de conformité). En pratique, ce test permet de déterminer si la distribution des valeurs de deux groupes est identique ou non. Nous utilisons les paramètres de distribution bilatérales, et de test sur deux échantillons de variances différentes (hétéroscédastique).

Lorsque l'identité est inférieure à 5%, on en conclue que les échantillons sont statistiquement différents (* sur les graphiques). Si l'identité est inférieure à 1% nous plaçons alors 2*.

RESULTATS

I Crible comportemental

91 lignées transgéniques ont été sélectionnées par notre équipe. Ces lignées provenaient d'un consortium de plusieurs laboratoires qui avaient procédé à des mutagenèses aléatoires. Il s'agissait d'insérer un transposon exprimant le facteur de transcription Gal4 dans le génome, et ainsi perturber l'expression de gène. Au final, plus de 5000 lignées furent ainsi générées. Certaines ont été produites par l'équipe de Doug Armstrong (Université d'Edinburg). Les résultats des marquages sont présentés sur le site web www.fly-trap.org, et les souches intéressantes nous ont été transmises afin d'être testées. D'autres ont été produites par le groupe de Kei Ito (Université de Tokyo). Ces données sont accessibles sur le site www.flybrain.org. Enfin, une dernière partie de ces souches a été produite au sein de notre laboratoire (Boquet, Hitier et al., 2000).

Un premier crible a été effectué en amont de ce travail et qui se devait de sélectionner les lignées exprimant le transgène dans les corps pédonculés. Le transposon s'insère de préférence dans les régions non codantes et donc a priori plutôt dans les régions de régulation (Spradling et al., 1995). Le Gal4 suit théoriquement le patron d'expression du gène dans lequel il s'est inséré. Ainsi une expression au niveau des corps pédonculés peut être due à l'insertion du transposon dans un gène impliqué dans la formation de la mémoire. Pour cela, les lignées Gal4 furent croisées avec une lignée exprimant un gène rapporteur (LacZ ou GFP, en fonction des laboratoires), et le patron d'expression fut analysé. Des coupes de cerveau d'individus double hétérozygote rapporteur/+ ; P-Gal4/+ ont été effectuées, ou des *in toto* (pour les lignées de Kei Ito et les nôtres). 91 d'entre elles présentent une expression du facteur dans les corps pédonculés, et ont ainsi été sélectionnées.

Après avoir effectué le crible comportemental sur l'ensemble des lignées Gal4, nous avons présélectionné 11 lignées présentant des scores de MLT significativement différents de nos contrôles.

MZ717, Gal4272, 227Y, Gal 4027, 144Y, c316, c824, c758, 30Y, 189Y, 72Y

Dans un soucis de rigueur, nous avons décidé de refaire ces expériences dans des conditions plus propres.

En effet, ce premier crible se déroula sur une période de plus de six mois, et ces lignées ne furent donc pas toutes testées en parallèle. De plus, les expériences de comportement présentent naturellement une forte variabilité intrinsèque, liée à la nature même

de l'expérimentation animale, les contrôles entre les différentes séries effectuées n'étant pas uniformes. Enfin l'insertion d'un élément mutagène affectant le cerveau n'est pas sans conséquence, et au fil des générations, des mutations de type suppressive peuvent être sélectionnées au sein de la souche mutante. Nous avons donc procédé à une série de croisements avec la souche originelle w^{1118} (CS) de manière à nettoyer le génome de ces mutations secondaires, de telle sorte à n'observer que l'effet de l'insertion de l'élément P dans le comportement de la drosophile. L'importance de l'homogénéisation du fond génétique fut étudié et démontré par de Belle et Heisenberg (de Belle and Heisenberg 1996). Enfin, nous avons attribué à chaque mutant putatif une lignée contrôle CS spécifique, correspondant à des mouches conditionnées au sein du même barillet et testées en parallèle pour plus de sécurité dans le contrôle de nos expériences.

A Bilan MLT après outcross

Les 11 lignées sélectionnées furent donc à nouveau soumises à un conditionnement espacé. Toutes les lignées présentent un défaut de MLT et sont significativement différentes de leurs contrôles, exceptées les lignées *MZ717*, *Gal 4272*, et *227Y* (figure 25). Ce résultat met en évidence l'intérêt de l'outcross, pour une étude génétique fine du comportement.

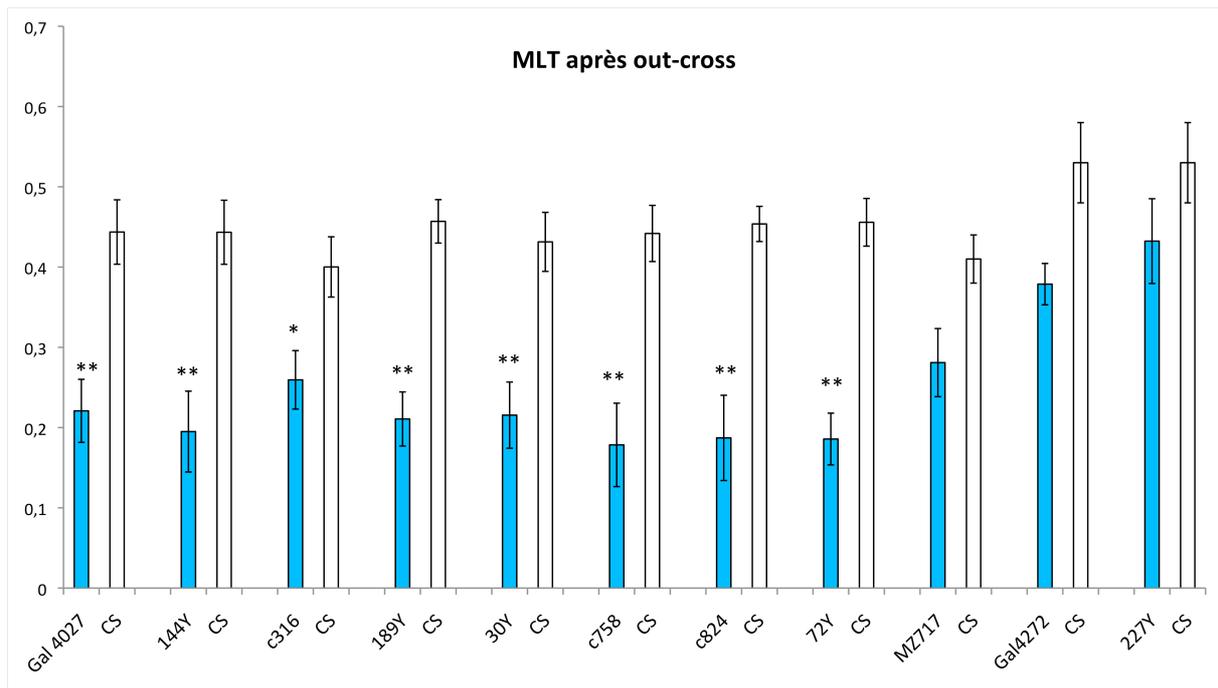


Figure 25 : étude de la mémoire à long terme chez les 11 mutants putatifs

Les scores de mémoire sont calculés 24h après un conditionnement espacé de 5 cycles. 9 lignées présentent des scores significativement différents des contrôles. *Gal4027*; n=18, t-test=0,0024; *144Y*; n=20, t-test=0,0035; *c316*; n 20, t-test= 0,014; *189Y* n=18, t-test=0,00039; *30Y*; n=19, t-test=0,0024; *c758*; n=19, t-test=0,0022; *c824*; n=17, t-test=0,0041; *72Y*, n=17, t-test=4,63x10E-5; *MZ717*, n=15, t-test=0,07; *Gal4272*, n=9, t-test=0,08; *227Y*, n=8, t-test=0,49

B MCT sur outcross

Nous avons continué notre analyse en vérifiant par la suite la mémoire à court terme. Nous avons donc exposé les mouches à un seul cycle de conditionnement, et nous les avons testées 2 heures plus tard. Les résultats sont présentés sur la figure 26.

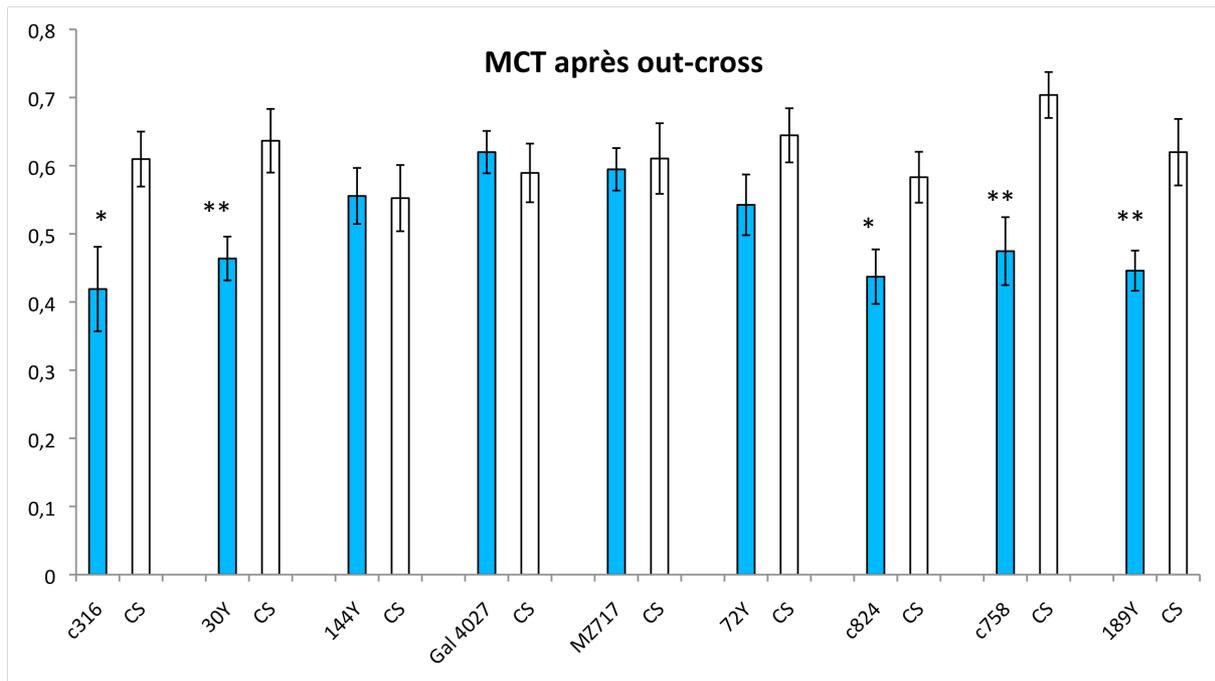


Figure 26 : étude de la mémoire à court terme chez les mutants sélectionnés

Les scores sont calculés 2h après un seul de conditionnement. *c316*, n=12 ; t-test=0,0186; *30Y*, n 11 ; t-test=0,00756; *144Y*, n=10 ; t-test=0,96; *Gal4027*, n=14 ; t-test=0,57; *MZ717*, n=9 ; t-test=0,79; *72Y*, n=10 ; t-test=0,10; *c824*, n=11 ; t-test=0,014; *c758*, n=10 ; t-test=0,0016; *189Y*, n=14 ; t-test=0,0067.

Seulement 4 lignées présentent des scores non significativement différents de ceux de la souche de référence CS. Il s'agit des lignées : *144Y*, *Gal 4027*, *MZ717*, *72Y* (figure 26) et correspondent donc potentiellement à des mutants de MLT

Les autres lignées présentent un défaut mnésique qui affecte également la mémoire à court terme.

C Massé sur outcross

Nous avons donc vérifié les capacités de mémoire résistante à l'anesthésie, 24h après un conditionnement massé, afin de vérifier si nos 4 lignées sont des mutants spécifiques de la MLT. Les résultats sont présentés sur la figure 27.

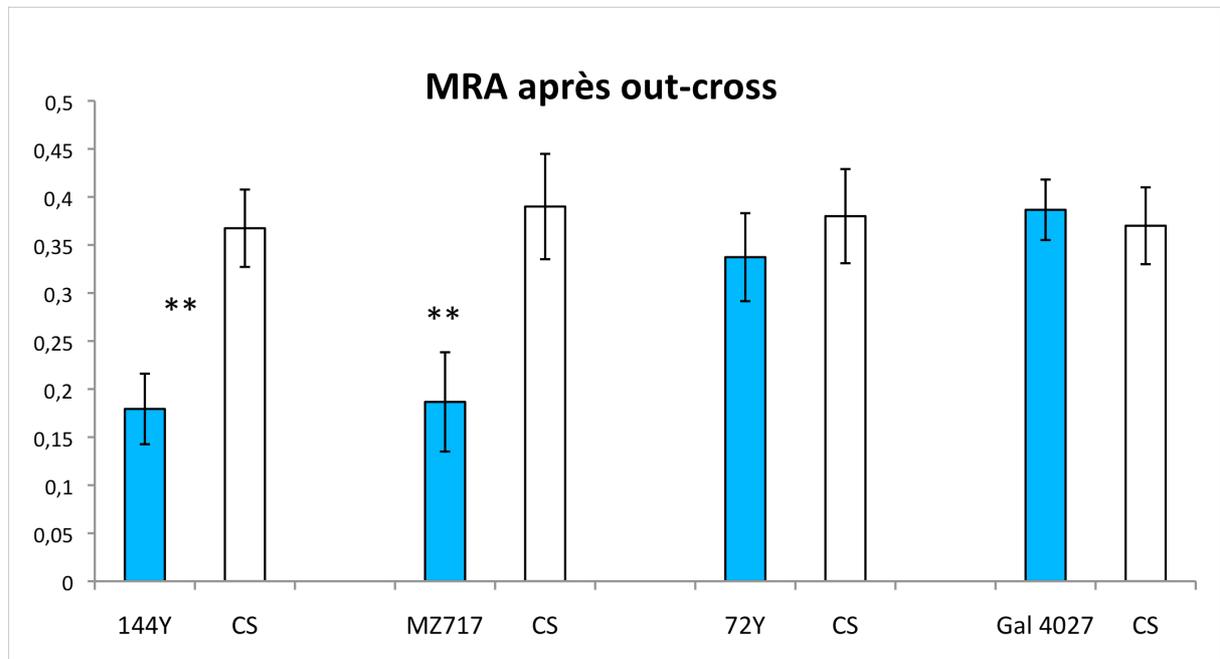


Figure 27 : étude de la MRA chez les mutants sélectionnés

Les scores sont calculés 24h après 5 cycles de conditionnement massé. *144Y*, n=12 ; t-test=0,0023; *MZ717*, n=11 ; t-test=0,00138; *72Y*, n=14 ; t-test=0,5344; *Gal 4027*, n=15 ; t-test=0,7873.

Ainsi seules les lignées *Gal4027* et *72Y* présentent des défauts spécifiques de mémoire à long terme.

D Olfaction 1

Nous présentons l'odeur MCH avec le choc électrique pendant une minute. Puis les drosophiles choisissent dans la machine à test soit d'aller vers un flux d'air sans odeur, soit vers le flux d'air contenant l'odeur OCT. Les résultats sont présentés figure 28.

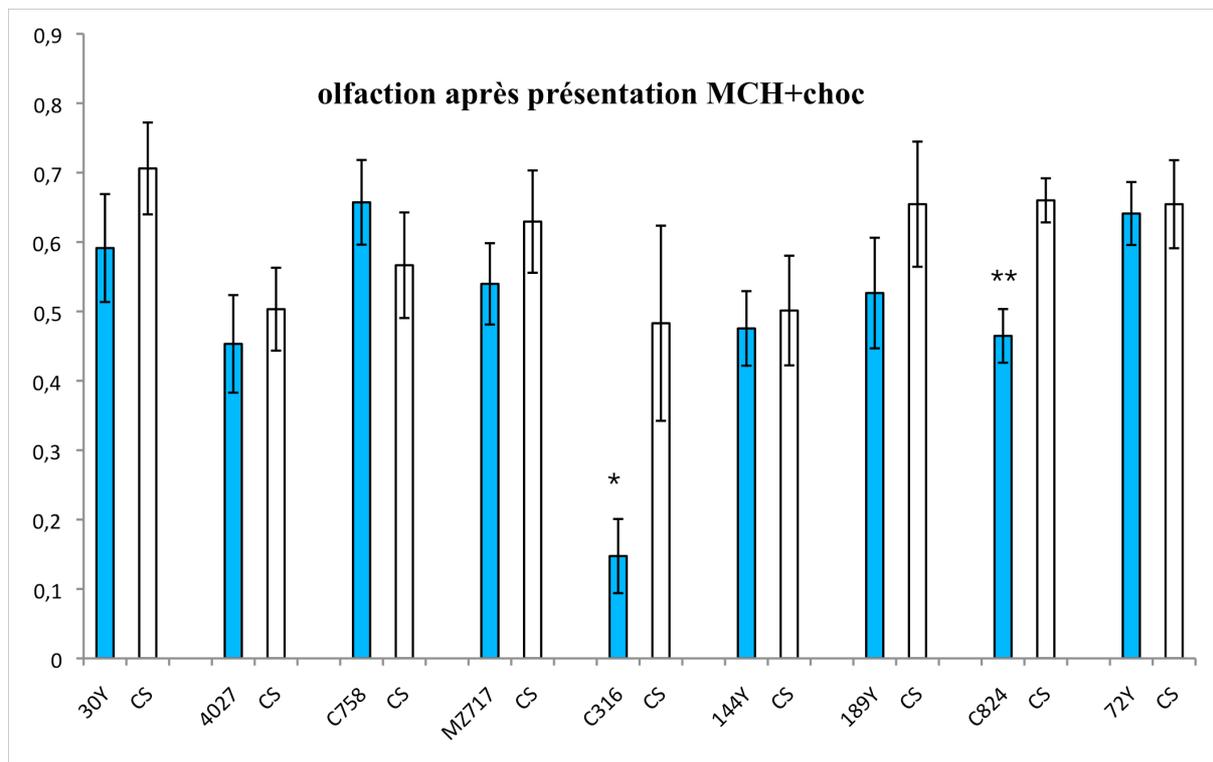


Figure 28 : étude de l'olfaction, et de la sensibilité à l'Octanol

Les mouches subissent l'association de MCH et d'un choc électrique. Seules les lignées *c316* et *c824* présentent un défaut d'olfaction. *30Y*, n=14 ; t-test=0,27; *Gal4027*, n=20 ; t-test=0,59; *C758*, n=16 ; t-test=0,36; *MZ717*, n=18 ; t-test=0,35; *C316*, n=8 ; t-test=0,045; *144Y*, n=16 ; t-test=0,789; *189Y*, n=10 ; t-test=0,30 ; *c824*, n=20 ; t-test=0,009; *72Y*, n=16 ; t-test=0,86.

Seules les lignées *c316* et *c824* présentent un déficit olfactif dans ces conditions (figure 28).

E Olfaction 2

Nous présentons l'odeur OCT avec le choc électrique pendant une minute. Puis les drosophiles choisissent dans la machine à test soit d'aller vers un flux d'air sans odeur, soit vers le flux d'air contenant l'odeur MCH. Les résultats sont présentés figure 29.

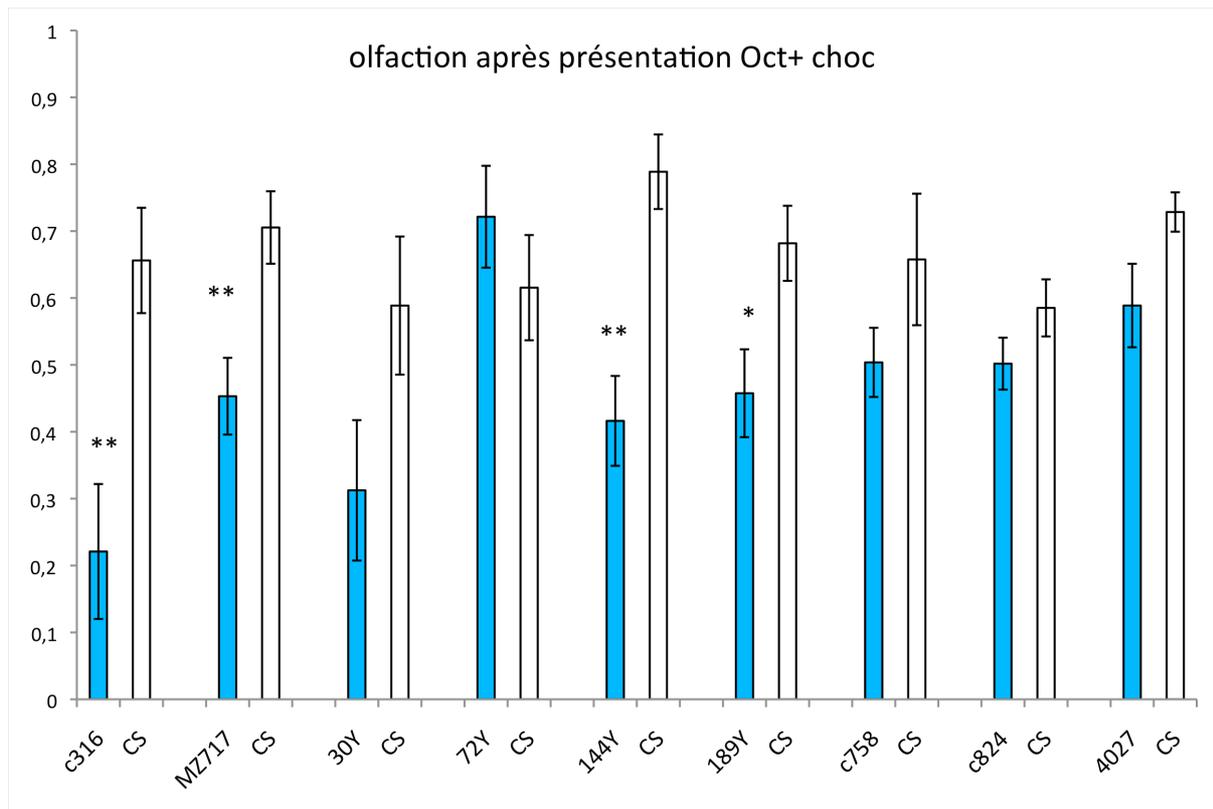


Figure 29 : étude de l'olfaction, et de la sensibilité au méthylcyclohexanol

Les mouches subissent l'association de OCT et d'un choc électrique. Seules les lignées *72Y*, *c758*, *c824*, *Gal4027* ne présentent pas de défaut olfactifs. *c316*, n=10 ; t-test=0,0034; *MZ717*, n=10 ; t-test=0,005; *30Y*, n=8 ; t-test=0,08; *72Y*, n=7 ; t-test=0,35; *144Y*, n=10 ; t-test=0,00049; *189Y*, n=10 ; t-test=0,0185; *c758*, n=6 ; t-test=0,20 ; *c824*, n=7 ; t-test=0,17; *Gal 4027*, n=9 ; t-test=0,067.

Seules les lignées *30Y*, *72Y*, *c758*, *c824*, et *Gal 4027* ne présentent pas de défauts olfactifs dans ces conditions (figure 29).

F Sensibilité aux chocs électriques

Finalement nous avons terminé notre caractérisation comportementale en vérifiant la sensibilité aux chocs électriques pour nos deux lignées, *Gal 4027*, et *72Y* (figure 30).

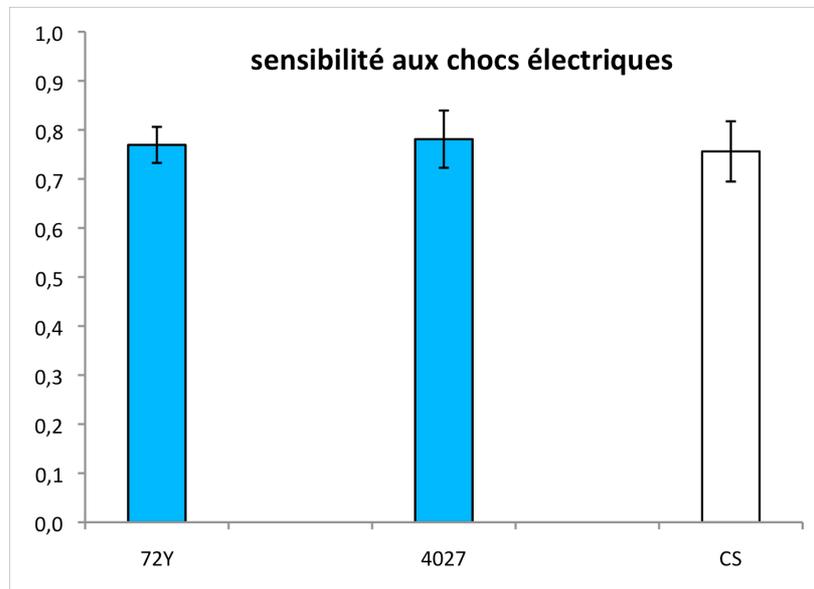


Figure 30 : étude de la sensibilité aux chocs électriques chez les mutants de MLT

Les mouches doivent choisir entre deux barillets, l'un étant parcouru par un courant électrique (n=10 pour tout les génotypes).

Bilan comportemental

Nous avons identifié deux lignées qui ne présentent qu'un défaut de mémoire à long terme spécifique : *Gal 4027*, et *72Y*. Deux autres lignées, *144Y* et *MZ717* présentent également des défauts spécifiques de MLT, mais ne détectent pas le MCH après choc électrique. Enfin la lignée *c758* présente des défauts de MLT et de MCT mais n'a aucun problème olfactif après choc électrique.

Nous avons concentré nos efforts sur les lignées *Gal 4027* et *72Y*, qui présentent les caractéristiques recherchées. Nous avons d'abord procédé à l'identification de la région affectée par l'insertion du transposon. Puis nous avons procédé à une étude moléculaire dans le cadre d'étude de gène impliqué dans la mémoire à long terme.

La liste 2 qui suit résume les phénotypes comportementaux des lignées sélectionnées.

liste 2 : Bilan comportemental des mutants sélectionnés.

lignées	avant outcross		après outcross						bilan
	5X espacés	-	5X espacés	1X 2h	5x massés	Oct	Mch		
MZ717	-	-	-	+	-	+	-	défaut olfactif	
Gal4272	-	+	-	-	-	+	-	défaut olfactif	
227Y	-	+	-	-	-	+	-	défaut olfactif	
Gal 4027	-	-	-	+	+	+	+	mutant spécifique de la MLT	
144Y	-	-	-	+	-	+	-	défaut olfactif	
c316	-	-	-	-	-	-	-	défaut olfactif	
c824	-	-	-	-	-	+	+	mutant de MCT	
c758	-	-	-	-	-	+	+	mutant de MCT	
30Y	-	-	-	-	-	+	-	défaut olfactif	
189Y	-	-	-	-	-	+	-	défaut olfactif	
72Y	-	-	-	+	+	+	+	mutant spécifique de la MLT	

II Identification des sites d'insertion et des gènes touchés

Pour identifier la région touchée par l'insertion de l'élément-P, nous avons effectué une « PCR-Rescue », comme décrite dans les parties matérielles et méthodes. Nous amplifions ainsi un fragment composé d'un morceau du transposon et de la région génomique adjacente. Ce fragment est inséré dans un vecteur pGEM-Teasy et envoyé à séquencer via les promoteurs T7 et SP6 chez la société MWG.

1. Gal4027

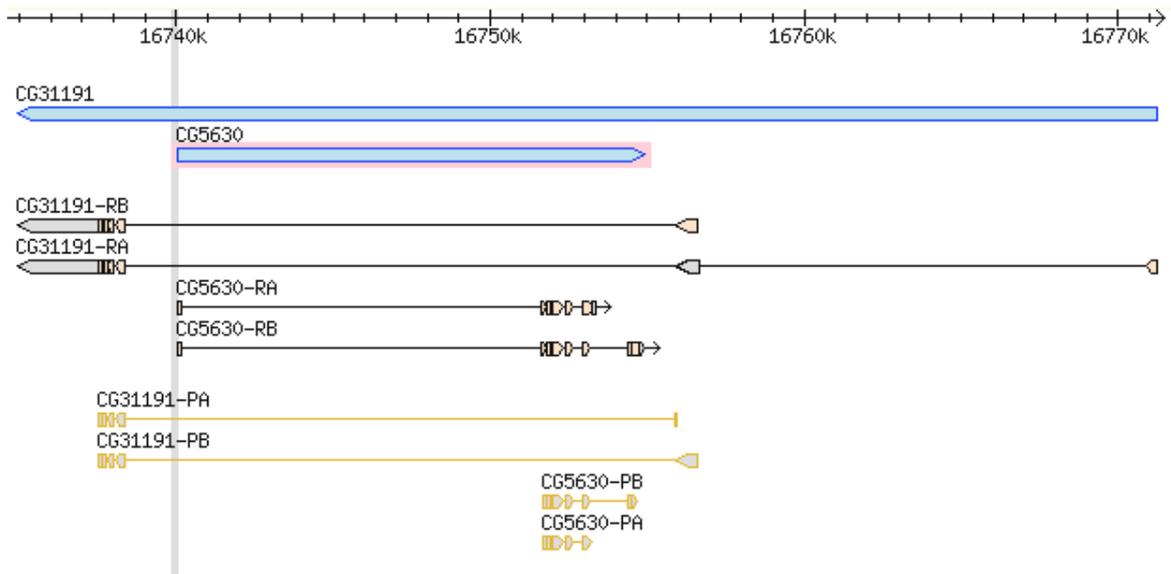
Dans le cas de la lignée *Gal4027*, le transposon peut potentiellement affecter deux gènes sur la région chromosomique 3R: CG31191, et CG5630 (figure 31). Il s'agit de deux gènes inconnus. Comme présenté dans le schéma qui suit, nous observons que ces deux gènes sont dans des orientations inversées. CG31191 est composé de plusieurs exons et introns dont les deux premiers sont très importants en taille. C'est au sein de ce second intron que se situe le gène CG5630, également constitué d'une longue région intronique.

Par rapport au gène CG31191, l'élément P est inséré au sein de son second intron, pouvant ainsi perturber l'expression de ce dernier. Par rapport au gène CG5630, l'élément-P se situe juste en amont du début du site de transcription, dans une zone qui pourrait être la région régulatrice.

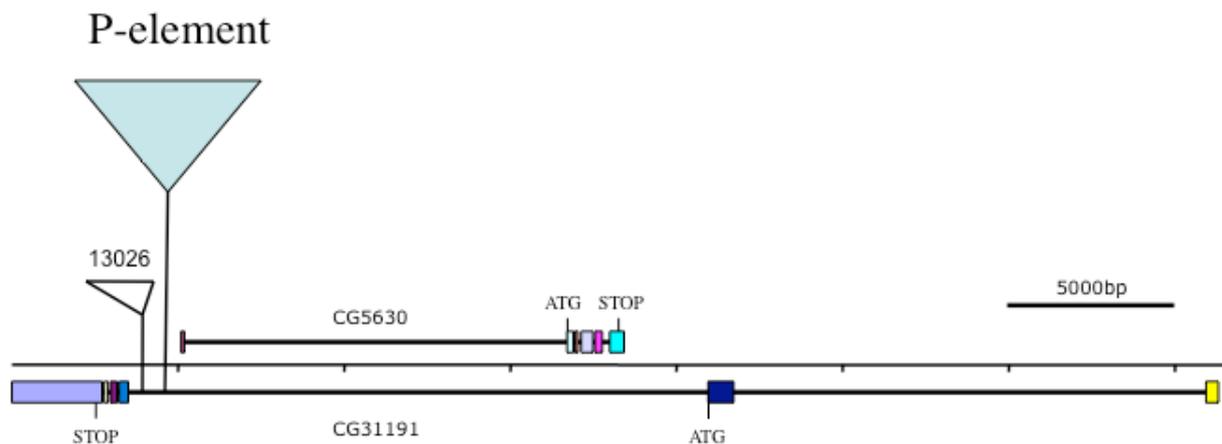
2. 72Y

Dans le cas de la lignée *72Y*, le transposon se situe entre deux gènes sur la région chromosomique 2L. Il est à plus de 8000pb de l'extrémité 3' du gène CG31973, et à 500pb en amont du gène CG11371, alias *debra* (figure 32).

Figure 31 : Cartographie de Gal 4027

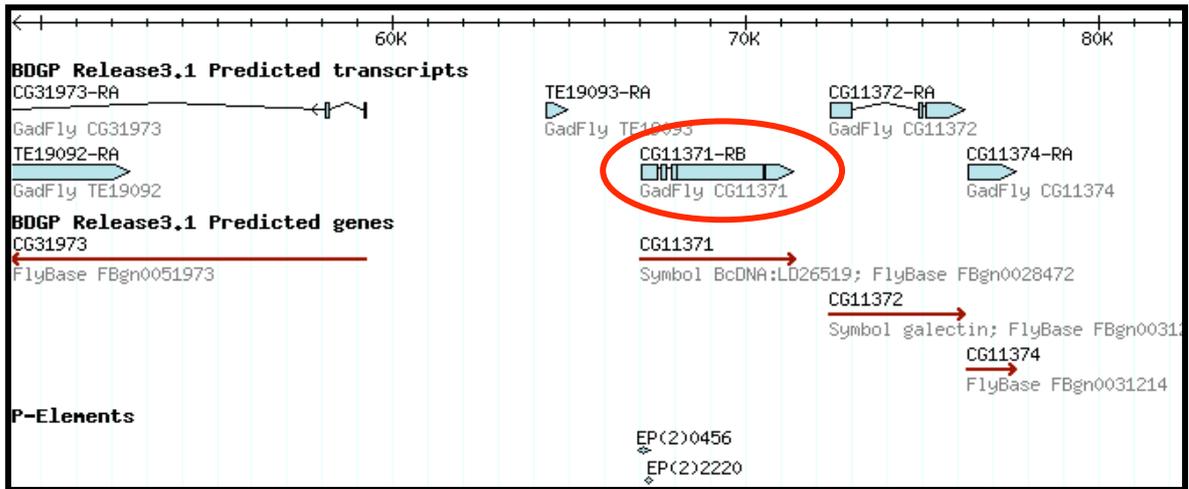


- La barre grise représente le site d'insertion de l'élément P.

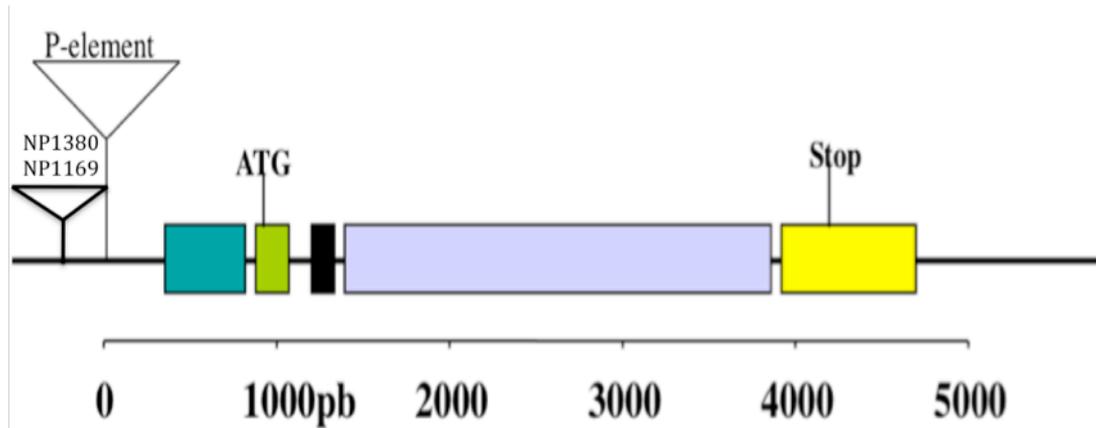


L'élément P de la lignée Gal 4027 est inséré au sein du 2nd intron du gène CG31191, et une 100^{aine} de paire de base en amont du gène CG5630. Une autre lignée 13026 présente une insertion d'un autre élément P quasi équivalente à la notre.

Figure 32 : Cartographie de 72Y



- Entouré de rouge le gène CG11371 alias Debra



Au sein de la lignée 72Y, notre élément P est inséré à environ 500pb du début du gène dbr. Deux autres lignées, NP1169, et NP1380, présentent également des insertions à 700pb du début du gène.

Nous avons ensuite procédé à une vérification des sites d'insertion en effectuant des PCR, avec des amorces à la fois sur l'élément P, et sur la région chromosomique adjacente. Nous avons utilisé l'oligo PGawB_{Low} sur le transposon avec les oligos suivants (figure 33).

- Oligo de vérification de Gal4027
CGGCAGTGTTTACCGCCAGATT
Taille attendue 282pb
- Oligo de vérification de 72Y
CGCGCTGATGGCTTACAGTACTCTT
Taille attendue 361pb

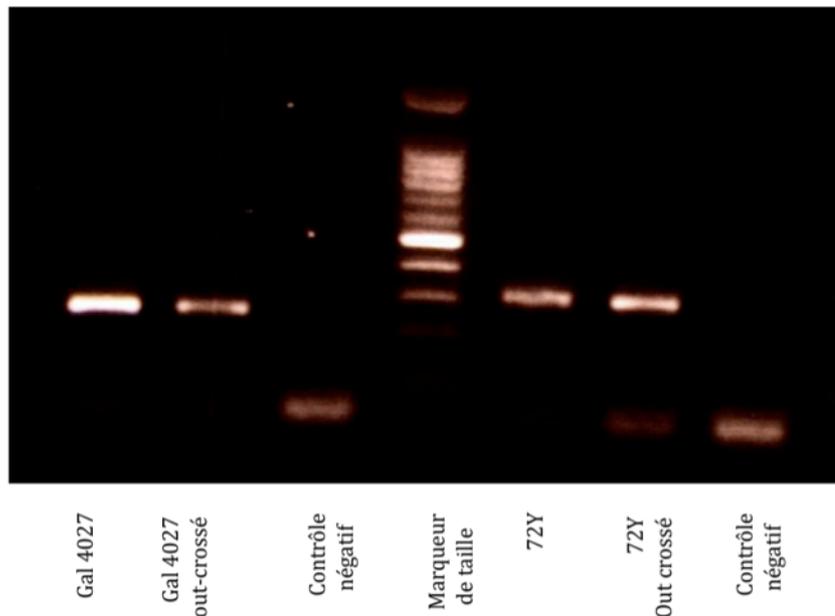


Figure 33 : vérification par PCR des sites d'insertion

Nous observons le même produit d'amplification entre les souches outcrossées et les souches non outcrossées. Ces produits ont la taille attendue par rapport au marqueur de taille ; la bande plus intense correspond à 500pb et celles du dessous font 400pb, puis 300pb. Les produits d'amplification sont spécifiques comme le prouve les contrôles négatifs réalisés sans matrice.

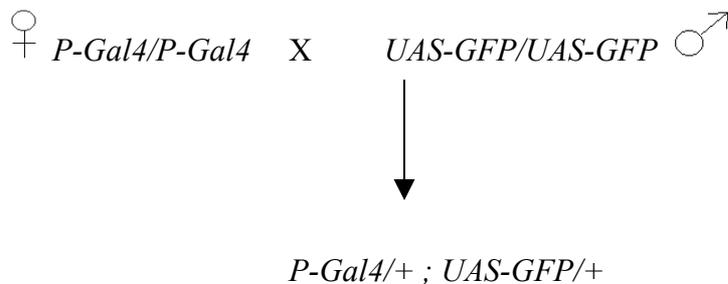
Nous avons également vérifié que dans les lignées outcrossées, et non outcrossées nous obtenons le même produit d'amplification, nous assurant ainsi du site d'insertion, et de la qualité de l'outcross.

Dans un premier temps, nous nous sommes procurés les vecteurs portant les ADNc des gènes correspondants. Nous avons fait séquencer les ADNc pour s'assurer qu'il n'y avait pas d'erreur de séquence risquant par la suite de fausser nos résultats. L'ADNc du gène CG31191 a une taille attendue de 4432pb ce qui correspond au plus grand transcrit potentiel

sur la carte ; la taille de l'ADNc du gène CG5630 fait pour sa part 1655pb (figure 31). Quant au gène *dbr* la taille de l'ADNc est 4039pb (figure 32).

III Patron d'expression du Gal4

Après avoir identifié la région chromosomique où les transposons se sont insérés, nous avons voulu vérifier par nous-même quel était le patron d'expression exact de nos lignées P-Gal4. Pour cela nous avons croisé les lignes Gal4027, et 72Y, avec une lignée exprimant la GFP sous le contrôle d'une séquence UAS. Ainsi le patron d'expression de la GFP suivra celui de notre Gal4. Nous observons alors au confocal le patron d'expression de la GFP.



Pour la lignée 72Y croisée avec la GFP, nous observons un très fort marquage au niveau des lobes α/β . Les lobes $\alpha'/\beta'/\gamma$ ainsi que le glomérules sont faiblement marqués (figure 34).

Pour la lignée Gal 4027, nous avons un fort marquage au niveau des lobes α'/β' , mais aussi, et cela plus faiblement au niveau des glomérules et des lobes γ (figure 35).

Dans les deux cas, nous observons une expression au niveau des corps pédonculés, site de la mémoire olfactive.

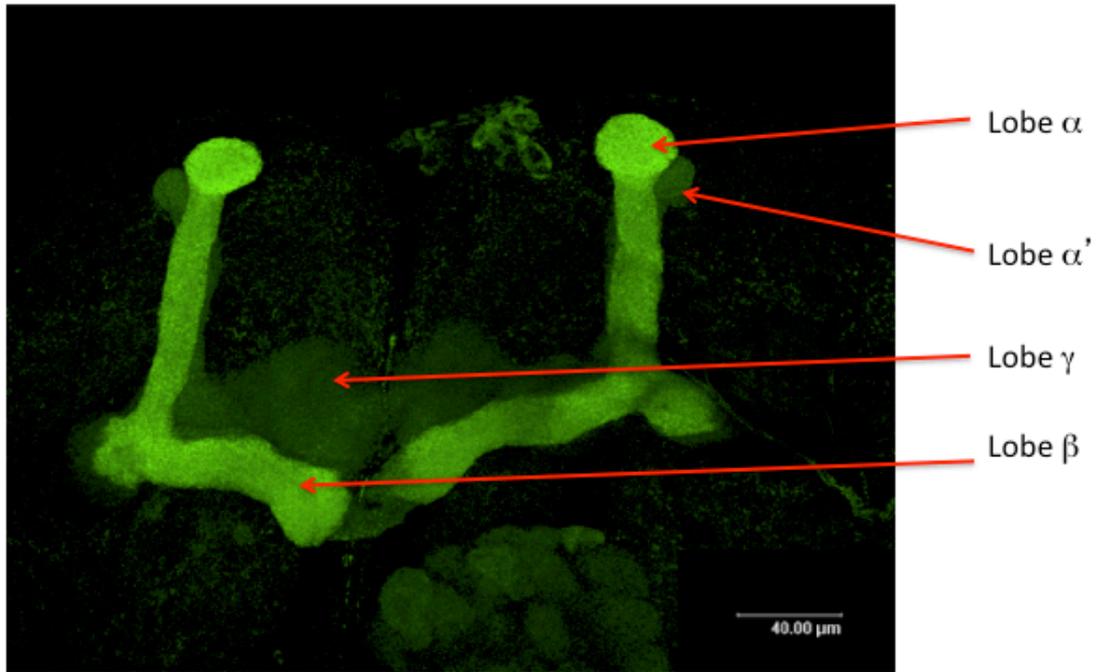


Figure 34 : Patron d'expression de CD8-GFP X 72Y

Marquage faible dans les lobes $\alpha'/\beta'/\gamma$, marquage fort dans les lobes α/β

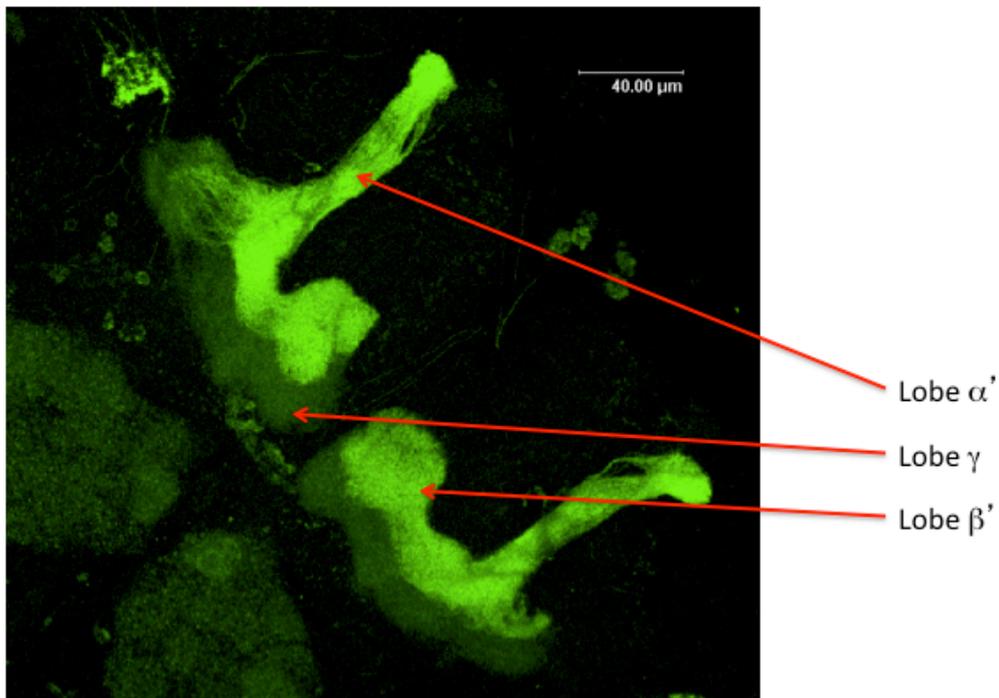


Figure 35 : Patron d'expression de CD8-GFP X Gal4027

Faible marquage des lobes γ ; marquage fort dans les lobes α'/β'

IV Qualité des transcrits

La première étape dans notre étude moléculaire de ces mutants fut d'analyser la qualité des transcrits. Nous avons pour cela effectué des Northern blots. Nous avons extrait les ARN totaux de têtes des individus 72Y, Gal4027, et de la souche de référence CS en grande quantité, puis récupéré les transcrits grâce à une colonne polyT. Nous augmentons ainsi la proportion des transcrits d'intérêt par rapport aux ARNr et ARNt. En effet, les premières tentatives ne nous ont pas permis la détection des transcrits exceptés ceux de la tubuline qui est notre contrôle.

1. Analyse des transcrits du gène CG5630

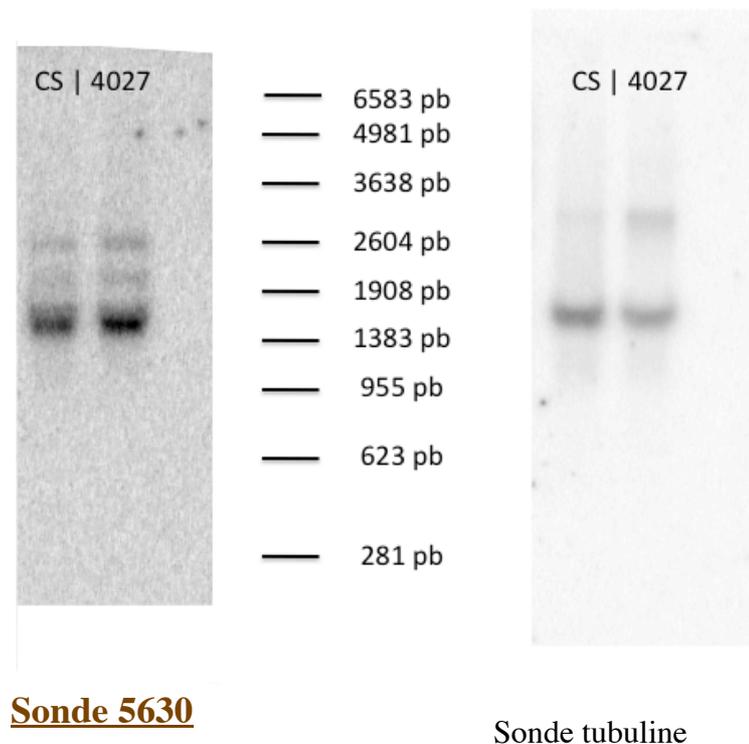


Figure 36 : Étude des transcrits du gène CG5630

Une sonde chaude (P^{32}) contre la région 3' du transcrite de CG5630 a été hybridée sur la membrane. Après stripping une sonde chaude contre la région 3' de la tubuline a été hybridée en tant que contrôle de migration. Nous n'observons pas de différence qualitative des transcrits, et ceux-ci ont la taille attendue.

Selon FlyBase, la taille attendue du transcrite du gène CG5630 est aux alentours des 1655pb. Nous observons une bande de taille comprise entre 1383pb, et 1908pb. La taille de la sonde contre la tubuline est de 1517pb, et nous observons une taille comprise entre 1383pb, et 1908pb, et cela également pour les autres expériences de northern blot réalisées.

Dans le cas de l'analyse du transcrit de CG5630 entre la souche référence CS et le mutant Gal4027, nous n'observons pas de différence qualitative (figure 36). Les transcrits ont les mêmes profils de migration et il en est de même pour ceux de la tubuline. Ainsi si ce gène doit s'exprimer, le transcrit aura la taille escomptée, et si la traduction a bien lieu la protéine aura à priori la séquence attendue. (On observe que dans la colonne de Gal4027, la tache radioactive semble plus importante, mais c'est également le cas pour ce qui est de la tubuline. Cette différence quantitative s'explique par des dépôts non homogènes malgré les étapes de quantification.)

2. Analyse des transcrits du gène CG31191

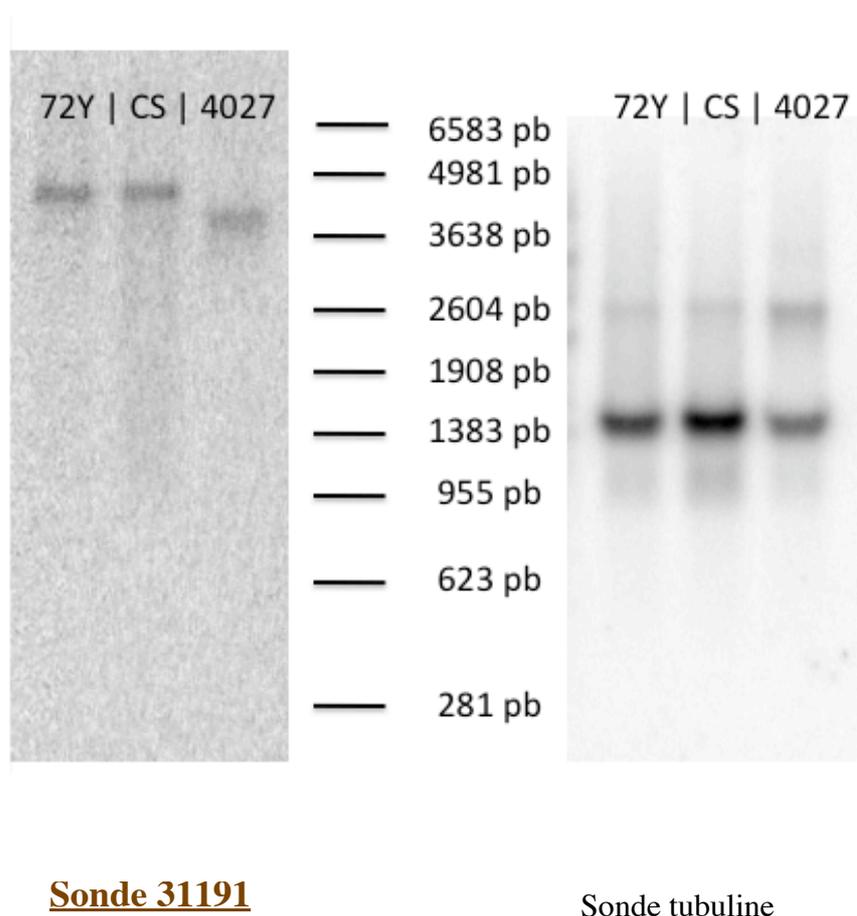


Figure 37 : Étude des transcrits du gène CG31191

Une sonde chaude (P^{32}) contre la région 3' du transcrit de CG31191 a été hybridée sur la membrane. Après stripping une sonde chaude contre la région 3' de la tubuline a été hybridée en tant que contrôle de migration. Le transcrit du gène CG31191 est plus court dans la lignée Gal4027.

Dans le cas de l'analyse du transcrit de CG31191, nous avons ajouté, comme second contrôle, le génotype de la lignée 72Y (second contrôle car à priori CG31191 n'est pas affecté dans la lignée 72Y). Dans le cas de l'hybridation avec la tubuline, nous observons la présence dans chacun des puits d'une bande dont la taille correspond à celle retrouvée sur l'autre membrane, et de taille attendue. Les profils de migration sont identiques (figure 37). Par contre pour la sonde contre le transcrit du gène CG31191, nous observons dans le cas de Gal4027 une bande de taille plus petite que celle des génotypes 72Y et CS. Théoriquement selon FlyBase la taille du transcrit du gène CG31191 est de 4432pb, ce qui semble être le cas dans les lignées CS, et 72Y, étant donné que la taille observée est comprise entre 4981pb et 3638pb. Il semble ainsi que la présence de l'élément transposable perturbe la transcription du gène CG31191, induisant un mauvais épissage qui conduit à un RNAm plus court.

Les variations d'intensité sont, comme dans le cas précédent, à imputer à des dépôts non homogènes malgré les étapes de quantification préalable.

Ainsi la présence du transposon au sein du deuxième intron du gène CG31191 pourrait conduire à un épissage imparfait. Les régions en amont du site d'insertion ne seraient alors plus présentes après l'épissage. Notre sonde ciblant la partie 3' de l'RNAm, nous observons alors un transcrit plus court dépourvu des premiers exons. Une autre hypothèse serait que la présence du transposon induise un début de transcription différent, entraînant un transcrit plus petit.

Analyse des transcrits du gène CG11371

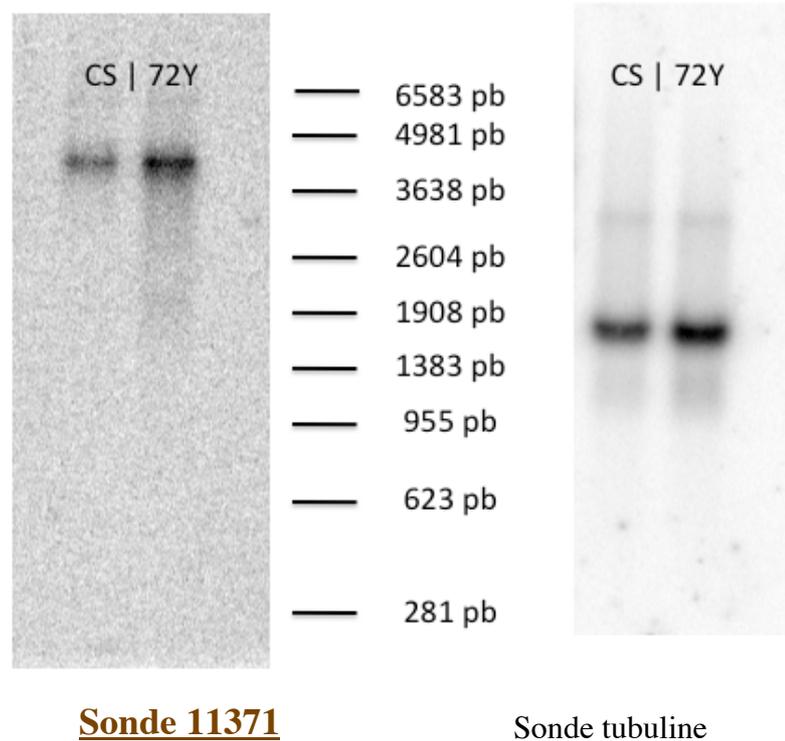


Figure 38 : Étude des transcrits du gène Debra

Une sonde chaude (P^{32}) contre la région 3' du transcrit de Debra a été hybridée sur la membrane. Après stripping une sonde chaude contre la région 3' de la tubuline a été hybridée en tant que contrôle de migration. Nous n'observons pas de différence qualitative des transcrits entre les différentes lignées.

Qu'il s'agisse de la souche de référence CS, ou du mutant de mémoire à long terme 72Y, les transcrits tubuline et Debra migrent de la même façon (Figure 38). Il n'y a aucune différence de qualité des transcrits. Nous observons un transcrit pour la tubuline d'une taille comprise entre 1383pb et 1908pb (taille attendue 1500pb), et pour dbr le transcrit est supposé faire une taille de 4039pb. La taille observée correspond à la taille attendue puisqu'elle est comprise entre 3638pb et 4981pb. L'élément P inséré bien en amont du gène perturbe certainement une région de régulation de l'expression de ce gène.

3. Bilan de l'analyse des transcrits

Il semble donc que le seul transcrit affecté de manière qualitative par la présence de l'élément mutagène soit le transcrit du gène CG31191. L'élément P est inséré dans le second intron de grande taille, et conduit à un RNAm plus court. La présence de ce transposon

conduit donc à un mauvais épissage, où les séquences en amont du P-Gal4 ne sont plus présentes dans la séquence détectée. En effet, nos sondes s'hybrident préférentiellement avec l'extrémité 3' des RNAm. Par contre les gènes CG11371 et CG5630 ne voient pas leur transcrit modifié par la présence de l'élément P. Ce dernier est dans les deux cas inséré en amont du gène, et perturbe plus probablement les régions de régulation de l'expression de ces deux gènes.

V Autres lignées Gal4

Nous avons dans un premier temps voulu confirmer nos résultats en commandant des lignées présentant des insertions équivalentes à celles que nous observons dans nos deux lignées mutantes. Grâce au Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP), nous avons pu commander des lignées P-Gal4 qui affectent les gènes identifiés de manière similaire.

Dans le cas de *Gal4027*, nous avons trouvé la lignée *13026* qui présente un transposon inséré en amont du gène *CG5630* et dans un intron de *CG31191*. Cette mutation est quasiment identique à celle présente dans *Gal4027* à quelque base près (voir figure 31).

Dans le cas de *72Y*, nous avons identifié deux lignées qui ont un élément P également inséré en amont du gène. Il s'agit des lignées *NP1169* et *NP1380*, dont l'insertion se situe respectivement à 672pb et 731pb du start de transcription. Ces deux insertions sont en amont de celle identifiée dans *72Y* (voir figure 32).

Présentant des mutations insertions de transgène identiques, nous n'avons pas analysé par Northern blot la qualité des transcrits de ces nouvelles lignées, et supposé qu'elles donnent lieu aux mêmes résultats.

Nous avons donc dans un premier temps nettoyé le génome des lignées reçues, pour s'assurer que les défauts éventuels soient bien le fait de l'insertion des transposons, et non dûs à un fond génétique différent, ne permettant pas les mêmes capacités d'apprentissage. Nous avons soumis ces lignées au long protocole, et testé leur mémoire 24h plus tard (figure 39). Nous observons pour toutes les lignées une chute significative de la MLT. Les lignées *72Y* et *Gal4027* servant de contrôles négatifs lors de ces expériences, et CS de témoin.

Nous avons ensuite cherché si ces défauts étaient bien spécifiques de la MLT, en soumettant les drosophiles au protocole massé. Nous n'observons aucune différence statistiquement significative avec la souche contrôle CS, même si la lignée *NP1169* présente une chute de 10 points par rapport à CS (figure 40).

Enfin nous avons vérifié que la mémoire à court terme 2 heures après un seul cycle de conditionnement était également normale. Comme dans le cas précédent, nous n'observons aucune baisse significative des capacités mnésiques des lignées sélectionnées (figure 41).

Les lignées *13026*, *NP1169*, et *NP1380* présentent ainsi le même phénotype comportemental que les lignées *Gal4027* et *72Y*, à savoir mutant spécifique de la MLT.

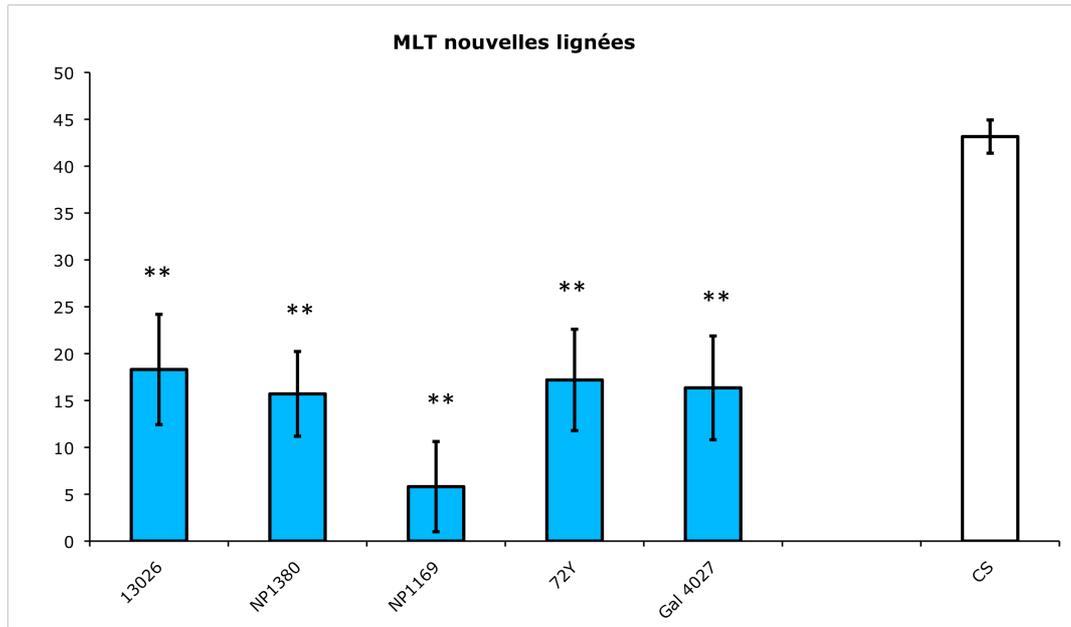


Figure 39 : étude de la MLT des nouvelles lignées

Après avoir été outcrossées, les lignées sont exposées à un conditionnement espacé, et leur mémoire testée 24h plus tard. Toutes présentent une chute significative par rapport au contrôle. Toutes les lignées sont significativement différentes du contrôle CS. (*13026*, n=5, t-test=0,011 ; *NP1380*, n=10, t-test= 2,33E-05 ; *NP1169*, n=8, t-test= 0,00029, *72Y*, n10, t-test= 0,00077; *4027*, n=10 t-test= 0,0083 ; CS, n=10)

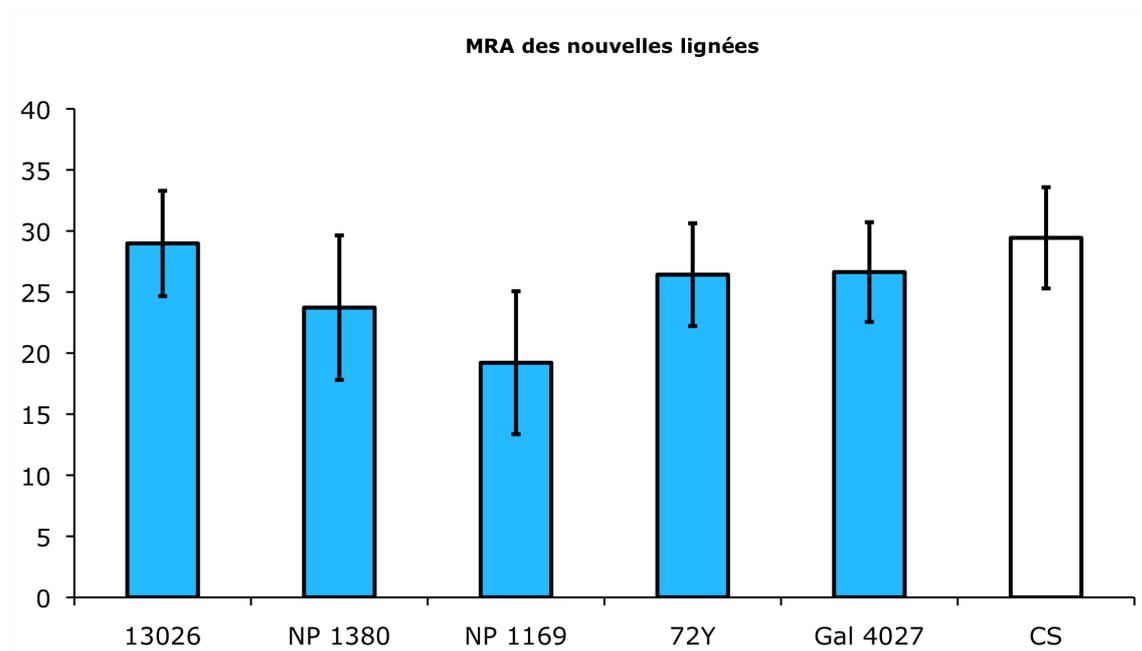


Figure 40 : étude la MRA des nouvelles lignées

Scores de mémoire des lignées outcrossées sont calculés 24h après 5 cycles massés. Il n'y a pas de différence avec la lignée de référence CS. n=15 pour toutes les lignées présentées. *13026*, t-test= 0,94; *NP1380*, t-test= 0,435; *NP1169* t-test= 0,165; *72Y* t-test= 0,613; *Gal4027* t-test= 0,63.

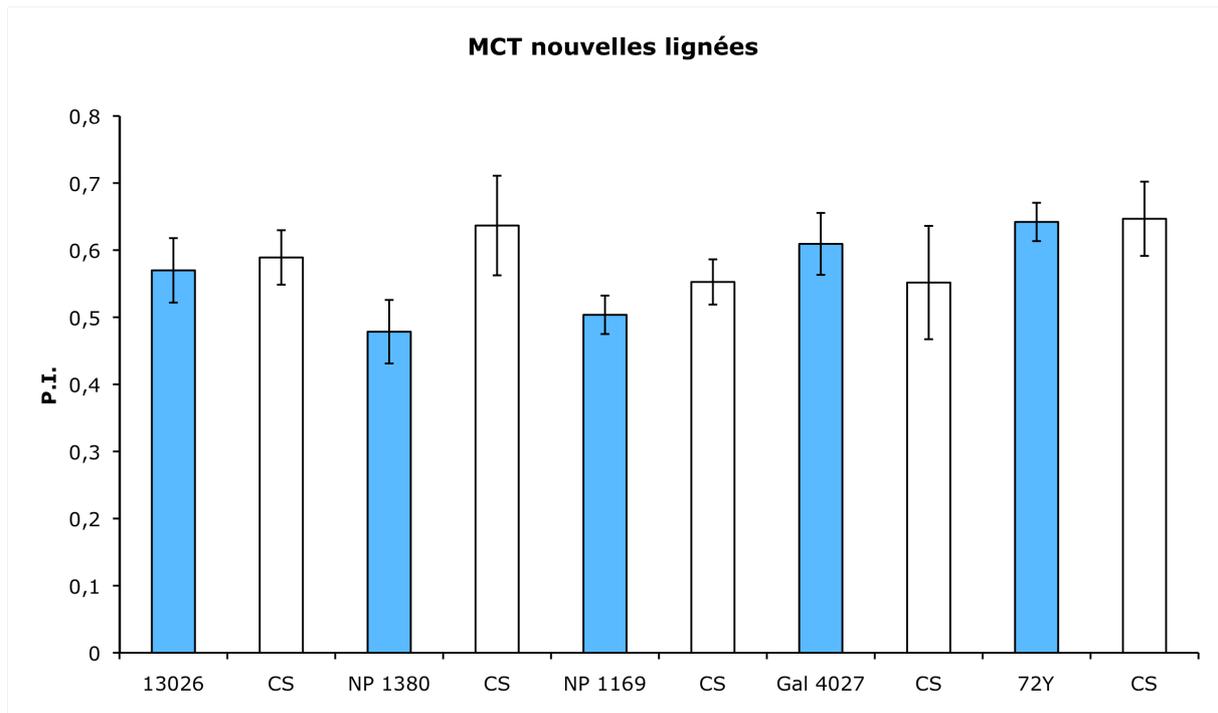


Figure 41 : étude de la MCT des nouvelles lignées

Après outcross, ces lignées sont exposées à un simple conditionnement et leur mémoire testées 2h plus tard. Chaque lignée a été testée 10 fois, et comparée à son propre CS. *13026*, t-test= 0,765; *NP1380*, t-test= 0,11; *NP1169* t-test= 0,295; *72Y* t-test= 0,569; *Gal4027* t-test= 0,94

VI Intégrité du cerveau

Nous avons vérifié l'intégrité des cerveaux et en particulier des MBs grâce à des marquages sur coupe paraffine. Nous avons utilisé soit les anticorps FasII, soit DCO pour marquer les lobes. Ces expériences permettent dans la limite possible de résolution de s'assurer qu'il n'y a pas de défaut de développement du centre anatomique de la mémoire. Ainsi les défauts de mémoire observés sont bien le fait de défauts de plasticité synaptique qui sont censés avoir lieu lors du remodelage du système nerveux pour la mise en place de la mémoire à long terme.

Pour la lignée *72Y* nous n'observons aucune différence anatomique au niveau des lobes par rapport à la souche CS que ce soit avec un marquage FasII ou bien avec marquage DCO (figure 42). En observant de manière plus précise un marquage DCO, nous observons des lobes α/β , ainsi que α'/β' en bonne intégrité (figure 43).

Quant à la lignée *Gal4027*, le marquage est rigoureusement le même qu'avec la lignée CS en utilisant un marquage DCO (figure 44). Nous observons parfaitement tous les lobes. En effectuant un marquage FasII et en observant de manière plus précise avec un plus gros grossissement, tout les lobes sont également parfaitement intègre (figure 45).

Nos lignées *72Y* et *Gal4027* ne présentent à notre échelle de résolution aucun défaut anatomique. Ainsi les défauts mnésiques observés ne sont pas dûs à des défauts de développement.

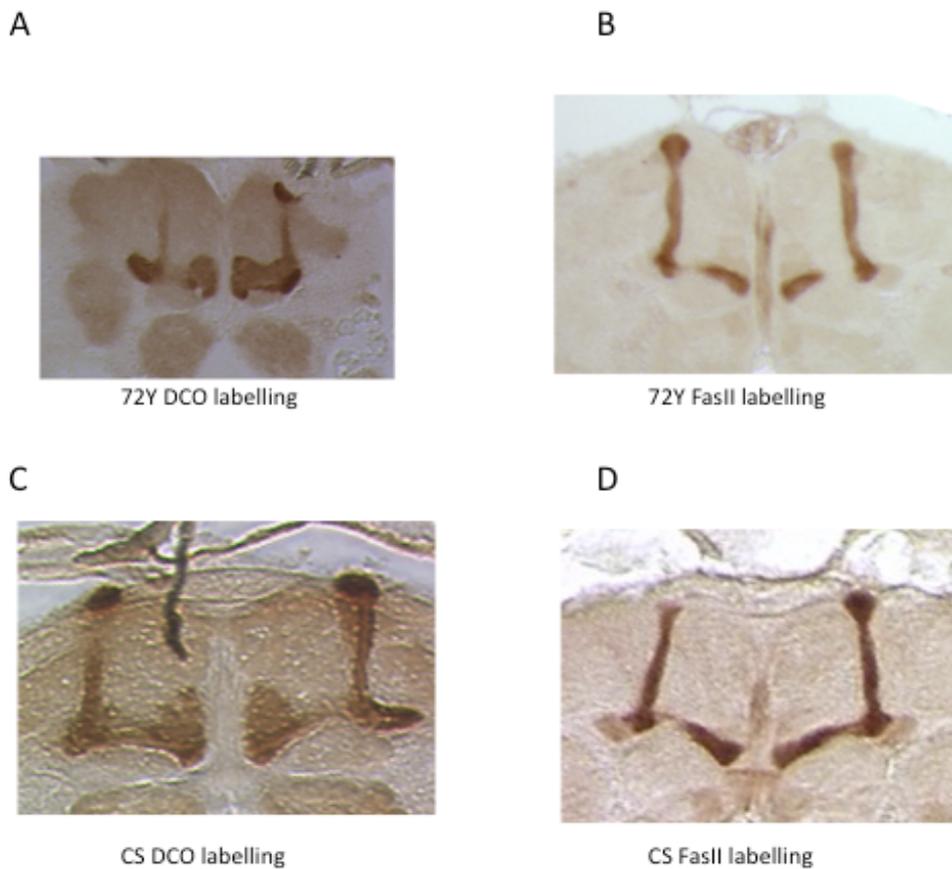


Figure 42 : Étude de l'anatomie de la lignée *72Y* affectant le gène *dbr*

A : marquage DCO de la lignée *72Y*, où nous observons les lobes α/β et γ , identiques à ceux de la lignée contrôle CS. Le marquage FasII est identique entre *72Y* (B) et CS (D) où nous observons dans les deux cas les lobes α/β .

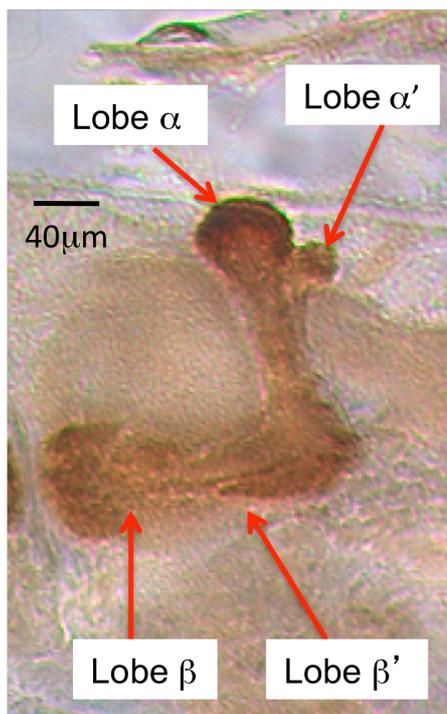


Figure 43 : Zoom sur le marquage DCO pour la lignée *72Y*

Marquage DCO de la lignée *72Y* qui permet de voir correctement l'anatomie normale des lobes α/β et α'/β'

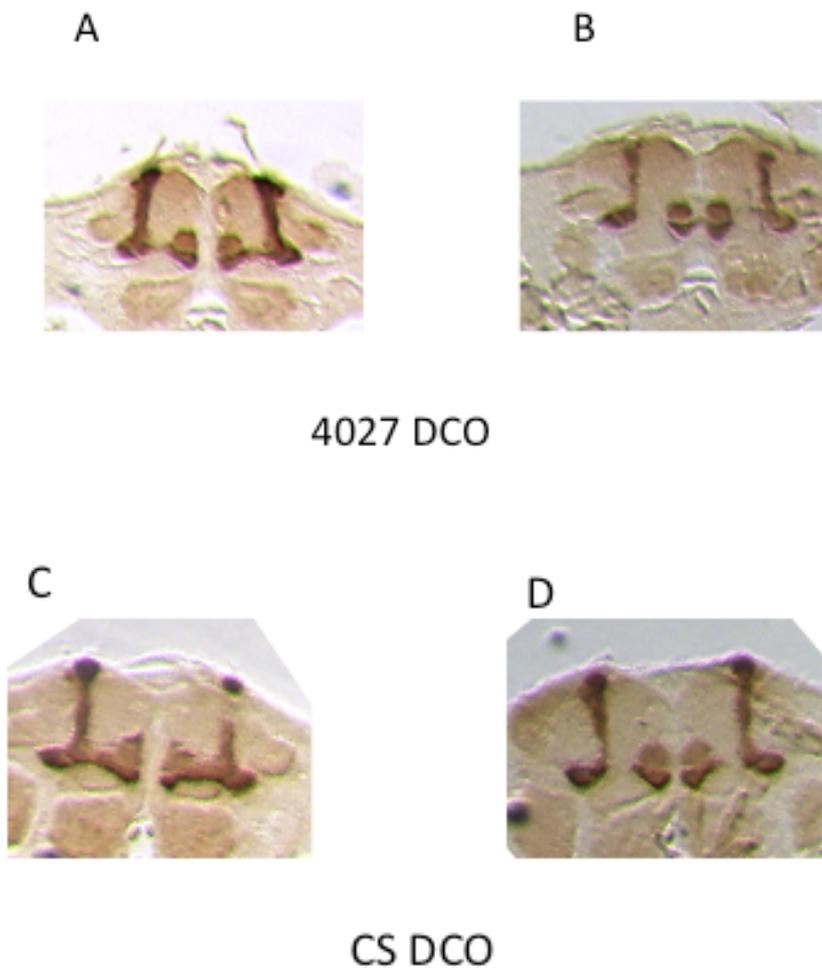


Figure 44 : Étude de l'anatomie de la lignée *Gal4027* affectant le gène *CG5630*

Les lobes $\alpha/\beta/\gamma$ sont marqués chez *Gal4027* (A) et ne présentent pas de différence avec la lignée contrôle CS (C). Il en est de même pour les lobes α'/β' (B et D).



Figure 45 : Zoom sur le marquage DCO pour la lignée *Gal4027*

Marquage DCO de la lignée *Gal4027* qui permet de voir correctement l'anatomie normale des lobes α/β et α'/β'

VII Variation après conditionnement

La mise en place de la mémoire à long terme nécessite l'expression *de novo* de gènes spécifiques (Tully, Preat et al., 1994). Il y a donc après conditionnement variation de l'expression de ces gènes qui peuvent être soit surexprimés après un conditionnement espacé, comme c'est le cas pour Teq (Didelot, Molinari et al., 2006), soit réprimés comme dans le cas du gène Cer (Comas, Petit et al., 2004). Nous avons donc conditionné en parallèle plusieurs groupes de mouche CS. Certaines étaient soumises au conditionnement espacé, d'autres à un conditionnement non apparié, où les chocs électriques et les odeurs n'étaient pas présentés de manière simultanée, ce qui ne conduit pas à un apprentissage. Néanmoins les stimuli présentés sont identiques en nombre et en durée.

Nous avons donc conditionné les mouches, puis congelé des échantillons toutes les demi-heures entre 0min après la fin du conditionnement, et 5 heures plus tard, soit au final 11 points de mesure de la variation du transcrit. Une autre partie de chaque échantillon est bien sûr conservée pour être testée le lendemain.

Il est possible de quantifier les mRNA via deux méthodes, l'une absolue, et l'autre relative. Dans le cas d'une méthode de quantification absolue, c'est la quantité totale de molécule cible qui est précisément quantifiée par rapport à une gamme étalon d'un gène référent. Tandis que dans le cadre d'une méthode d'analyse relative, nous calculons un ratio entre les transcrits du gène d'intérêt, et les transcrits d'un gène de ménage, qui ne doit pas varier dans les conditions expérimentales. Ce ratio est calculé dans le cadre expérimental, et dans le cadre contrôle, et un nouveau ratio entre ces deux rapports est alors calculé et qui représente au final la variation dudit transcrit.

$$\frac{[\text{mRNA Gène X (trained)}/\text{mRNA tub (trained)}]}{[\text{mRNA Gène X (naïve)}/\text{mRNA tub (naïve)}]}$$

1. Variation des gènes CG31191 et CG5630

Ces études sont effectuées sur des extraits d'ARNm de tête de drosophile. Les conditionnements, extraction et dosage d'ARNm ont été effectués par Daniel Comas anciennement post-doc au sein du laboratoire, pour des expériences de puce à ADN. L'analyse statistique a été effectuée selon les recommandations de la société Qiagen qui nous a fourni les kits. Nous avons fait un test de type Student (one sample t-test), à distribution bilatérale, en considérant les échantillons de variances différentes.

Le gène CG31191 ne semble pas présenter de variation significative après conditionnement. Hormis à $t=0$, où il semble y avoir une variation, de 30minutes à 5h après le conditionnement le taux de transcrit ne varie quasiment pas (figure 46). Le point à 4h aurait présenté une différence si le test avait été à distribution unilatérale, mais dans notre cas l'identité entre nos deux échantillons est de 10%. Or le seuil de confiance est de 5%, et celui-ci n'est pas atteint dans ce cas.

Pour le gène CG5630, nous observons, tout comme pour le gène CG31191, une augmentation du transcrit juste après la fin du conditionnement. Celle-ci n'est pas significative et pourrait être liée aux conditions expérimentales puisque retrouvée dans le cas des deux gènes. Par contre nous observons 1h30 après la fin du protocole une très nette chute du taux de transcrit. Il n'y a plus que 40% de transcrit du gène CG5630 à ce moment précis. Cette chute est significative, puisque le taux d'identité entre les mouches conditionnées et les contrôles est de $6,977 \times 10^{-5}$. Le taux de transcrit retourne ensuite rapidement au niveau basal. Il apparaît ainsi un moment très précis après le conditionnement espacé où le gène CG5630 semble être réprimé pour mettre en place la MLT (figure 47).

Etant donné les variations relativement faibles observées, une confirmation de ces résultats par une autre approche serait prudente (par exemple, par hybridation *in situ* sur coupe de cerveau (Didelot et al., 2006)).

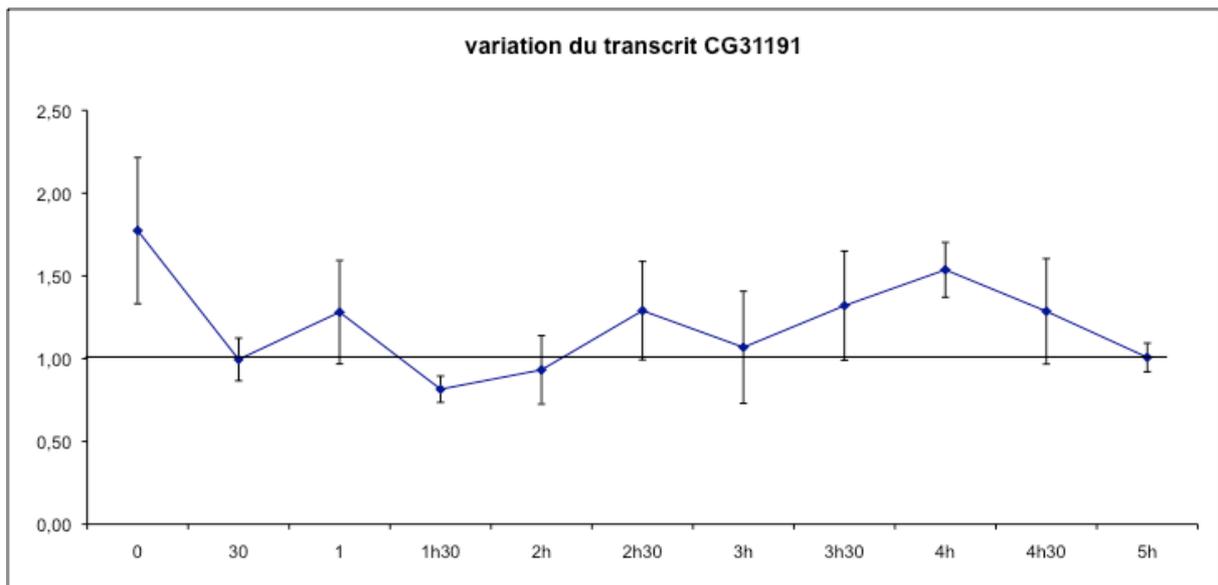


Figure 46 : Étude de la variation du transcrit du gène CG31191 par RT-PCRq :

Malgré une variation à $t=0$, il n'y a pas de variation significative après conditionnement espacé. N=4 pour chaque point.

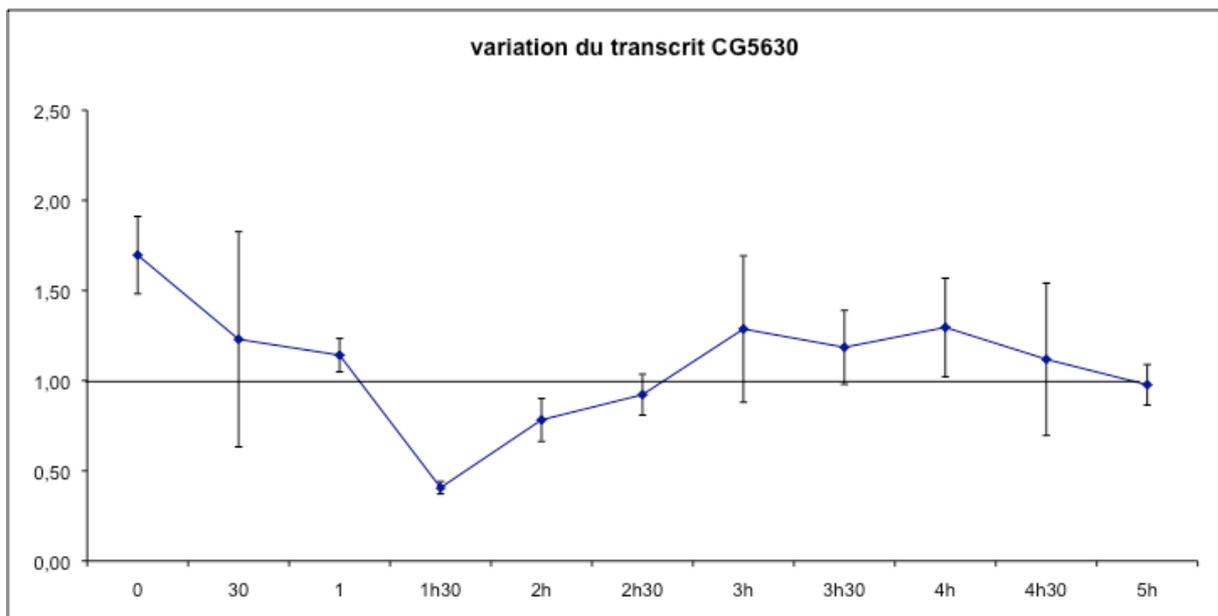


Figure 47 : Étude de la variation du transcrit du gène CG5630 par RT-PCRq :

Nous observons une chute significative 1h30 après conditionnement espacé. N=4 pour chaque point

Étude statistique des variations des gènes CG31191, et CG5630 aux différents temps

temps	0h	30 min	1h	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	4h30	5h
CG31191	0,18	0,97	0,42	0,10	0,80	0,43	0,86	0,51	0,08	0,46	0,94
CG5630	0,06	0,73	0,27	6,977.10E-5	0,21	0,54	0,53	0,53	0,39	0,81	0,87

2. Variation de Debra

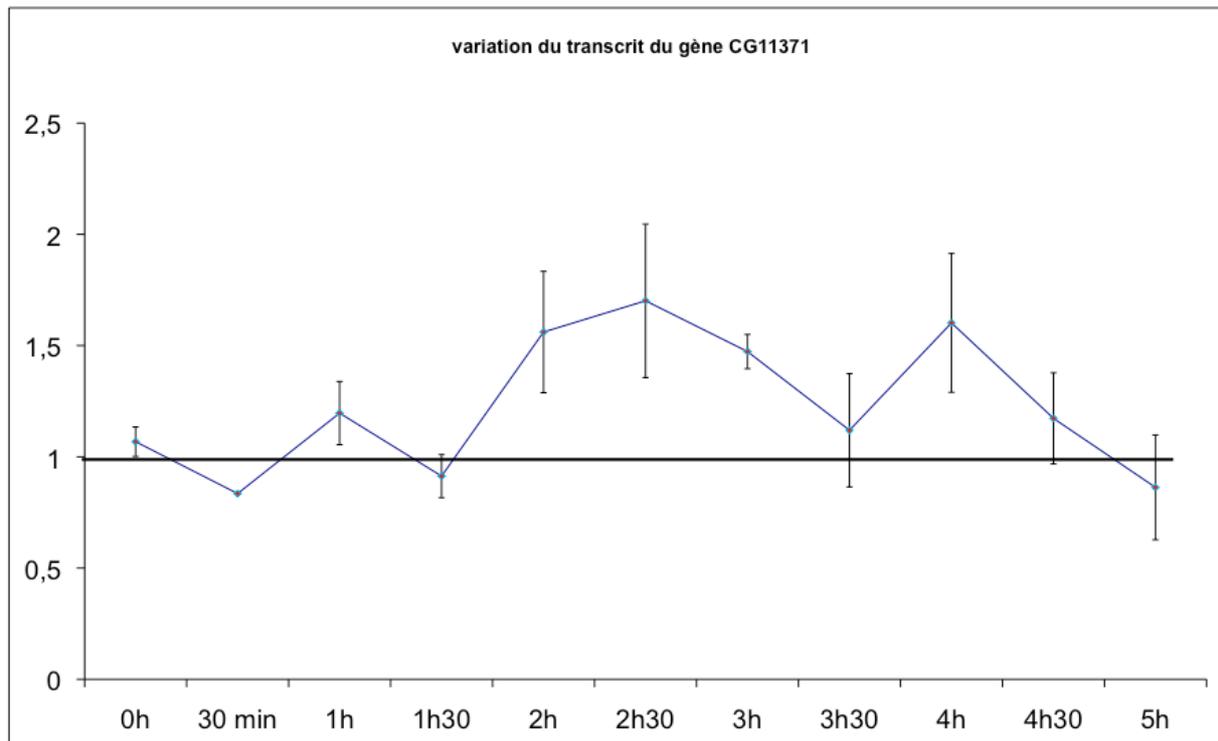


Figure 48 : Étude de la variation du transcrit du gène *debra* par RT-PCRq :

N=4 pour chaque point

La variation du transcrit de Debra après conditionnement fait apparaître une cloche entre les points 1h30 et 3h30 après conditionnement. Il semble ainsi que l'expression du transcrit augmente progressivement de 2h à 3h après le conditionnement espacé pour retourner à un niveau basal par la suite. Durant toute cette période, les résultats du test de student sont d'environ 10%, ce qui montre que nous ne sommes pas éloignés du seuil de significativité. Néanmoins nous observons un second pic plus restreint et non significatif du fait du fort écart-type, au point 4h après la fin du protocole (figure 48).

Étude statistique des variations du gène CG11371 aux différents temps

temps	0h	30 min	1h	1h30	2h	2h30	3h	3h30	4h	4h30	5h
CG11317	0,492838	0,15353	0,398424	0,5346264	0,131889	0,134929	0,102769	0,685417	0,149217	0,487726	0,618687

VIII RNAi

Pour confirmer définitivement l'implication de nos gènes dans la mise en place de la mémoire à long terme chez la drosophile, nous avons procédé à la construction de RNAi. Dans le cas du mutant Gal 4027, nous pourrions ainsi établir lequel des gènes CG31191 et CG5630 est le responsable du phénotype perte de mémoire, et pour le mutant 72Y confirmer le rôle du gène *debra*.

Nous avons tenté de dessiner des séquences spécifiques pour construire nos RNAis. Pour le gène CG31191 choisir une séquence spécifique n'est pas trop problématique dans le sens où étant de grande taille, sa région 3' n'est pas chevauchante avec celle de CG5630. Par contre dans le cas de CG5630, la totalité de sa séquence est complémentaire avec une partie de celle de CG31191. Nous avons alors choisi de préférence une région intronique chez CG31191 pour dessiner le RNAi de CG5630. Pour CG31191, la séquence ciblée a une taille de 419pb, et pour CG5630 de 298pb. Nous avons également sélectionné des lignées provenant de la collection viennoise VDRC (Dietzl, G., D. Chen, et al., 2007), et qui présente des constructions différentes des nôtres. La séquence cible du gène CG31191 est de 343pb, et pour CG5630 de 308pb

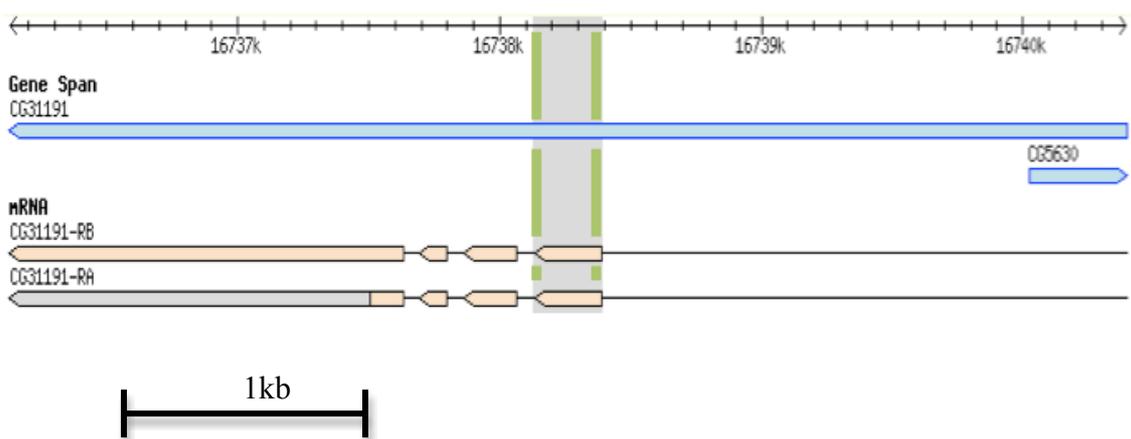
Enfin, pour Debra nous n'avons pas eu de problème pour choisir une séquence spécifique, car il n'y a pas un autre gène inclus dans l'unité de transcription Debra. Nous avons sélectionné une région de 559pb. Et nous avons également commandé une lignée RNAi de la collection viennoise VDRC d'une longueur de 325pb.

Les séquences cibles de nos RNAis sont représentées sur les schémas suivants, figure 49.

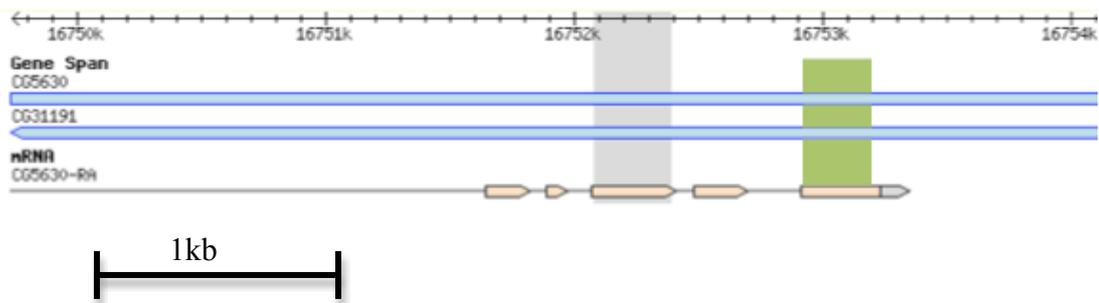
Figure 49 : Localisation des RNAis

Les RNAis que nous avons dessinés sont représentés par les barres vertes ; ceux en provenance de VDRc, sont en gris. Pour CG31191, la séquence du RNAi de chez VDRc est comprise dans celle que nous avons dessinée. Pour CG5630, les séquences cibles ont été choisies sur des exons différents. Quant à *dbr*, les deux séquences se chevauchent.

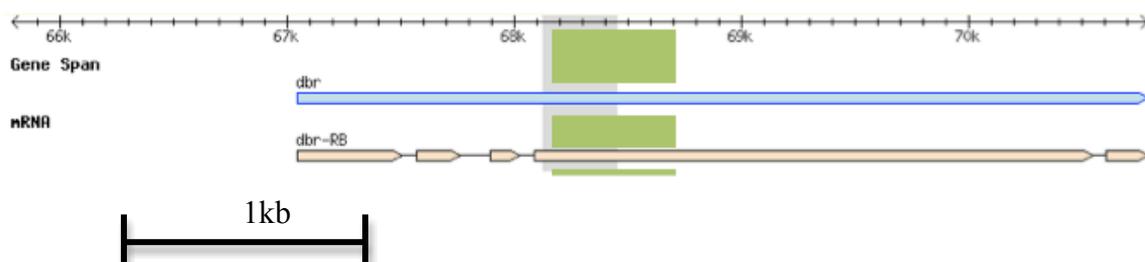
- Les RNAis de CG31191 sont représentés dans le schéma ci-dessous.



- Les RNAis de CG5630 sont représentés par les régions grisées et vertes dans le schéma ci-dessous.



- Les RNAis de Debra sont représentés ci-dessous dans le schéma suivant.



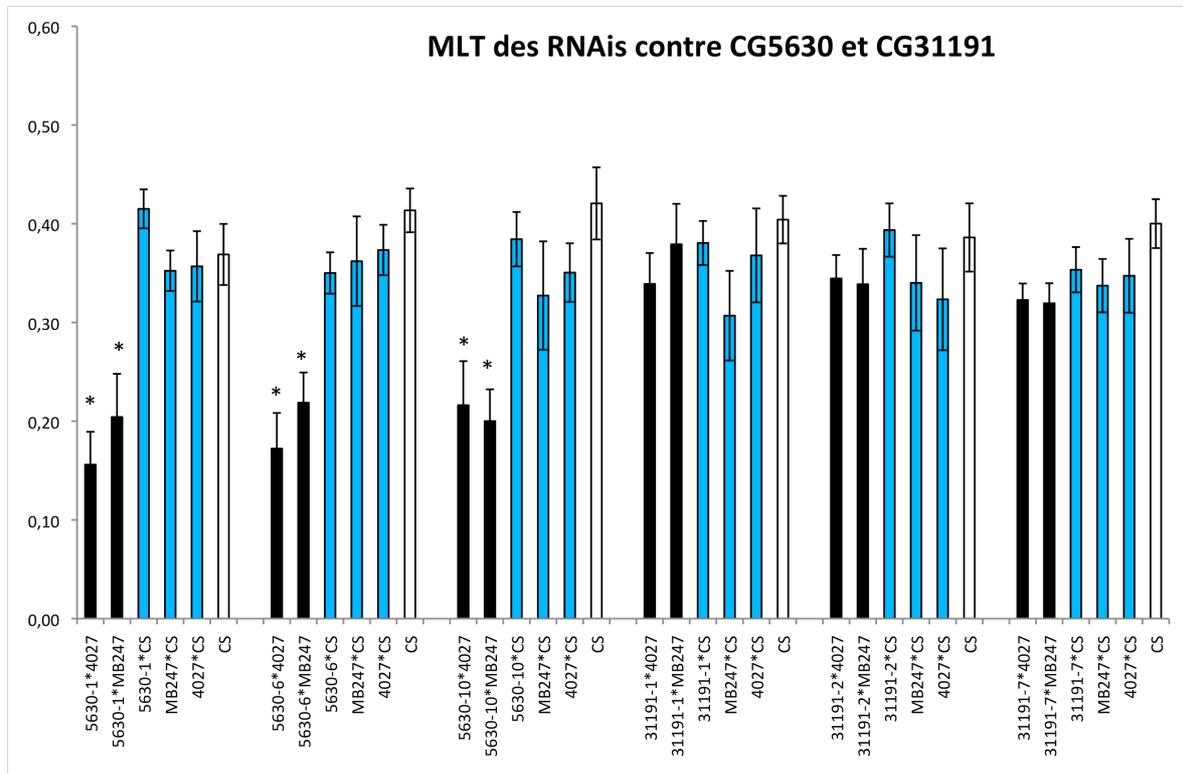
Gal 4027

Dans le cadre d'étude du mutant Gal 4027, nous avons surexprimé les RNAi contre les gènes CG5630 et CG31191 dans les CPs tout au long du développement et chez l'adulte grâce au pilote d'expression *MB247*. Celui-ci permet une localisation des RNAi dans une majeure partie des neurones des lobes α/β et γ des CPs. Nous avons également surexprimé ces RNAi avec le pilote d'expression de Gal 4027 qui semble restreindre l'expression au niveau des lobes α'/β' seulement. Les contrôles hormis l'habituel CS sont les pilotes d'expression utilisés à l'état hétérozygote *Gal4027/+* et *MB247/+*, ainsi que les *RNAi/+*.

Pour chaque gène, nous avons étudié 3 insertions distinctes de nos constructions. La souche référence CS, ainsi que *4027/+*, *MB247/+* et *RNAi/+* présentent dans tous les cas des scores de mémoire supérieurs à 0,35 en moyenne, ce qui montre qu'à l'état hétérozygote, ils ne sont pas responsables d'un défaut mnésique. De plus d'après le test de student ils ne présentent pas de différence avec la souche référence CS. Nous n'observons pas de chute de mémoire après expression du RNAi contre CG31191 que ce soit avec les pilotes d'expression Gal4027 ou MB247. Par contre exprimer un RNAi contre CG5630 aboutit à une chute de mémoire significative (résultats du test de student tableau 1) que ce soit avec MB247 ou avec Gal4027 comme pilote d'expression (figure 50). Il semble donc que ce soit CG5630 qui soit responsable du défaut de mémoire à 24h chez Gal4027.

Nous avons par la suite vérifié que la MRA (figure 51) ainsi que la MCT (figure 52) étaient normales. Nous n'observons aucune différence par rapport aux contrôles lors de ces deux expériences. Ainsi surexprimer le RNAi contre CG5630 dans les lobes α/β et γ , ou seulement en suivant le patron d'expression de Gal4027 à l'état adultes et au cours du développement, conduit à une chute de mémoire spécifique de la MLT.

Figure 50 : Étude de la MLT chez des individus exprimant les RNAi contre CG5630 et CG31191 chez l'adulte et au cours du développement.

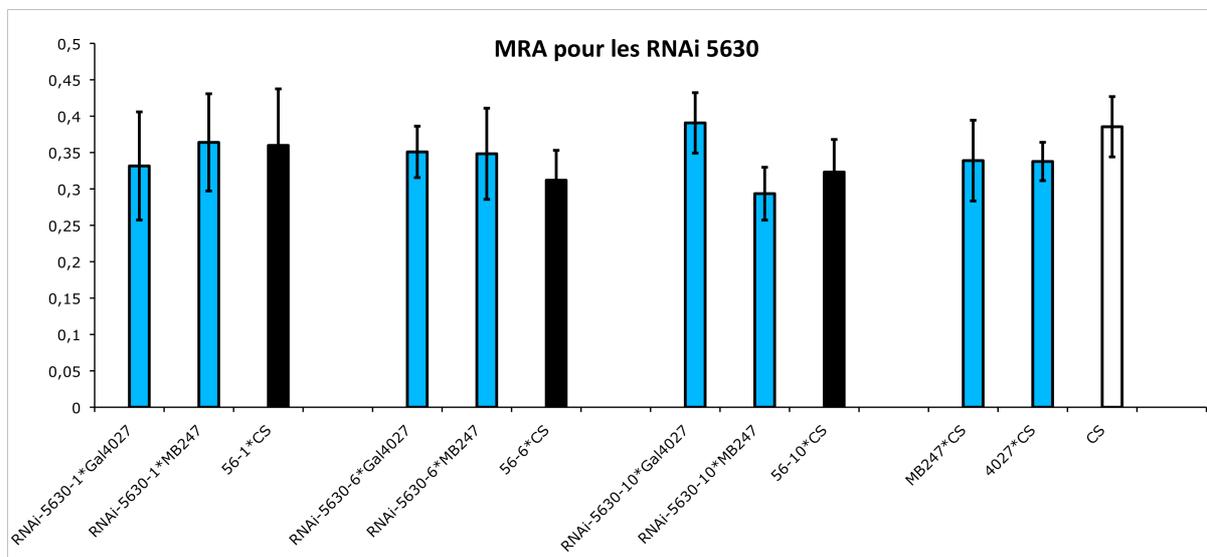


PI calculés après 5 cycles espacés n=10-14. Les astérisques indiquent une différence significative dans le test de Student ($P < 0,01$) par rapport aux lignées utilisées comme témoins.

Tableau 1 : Étude comparative statistique des différences de résultat pour le RNAi contre CG5630

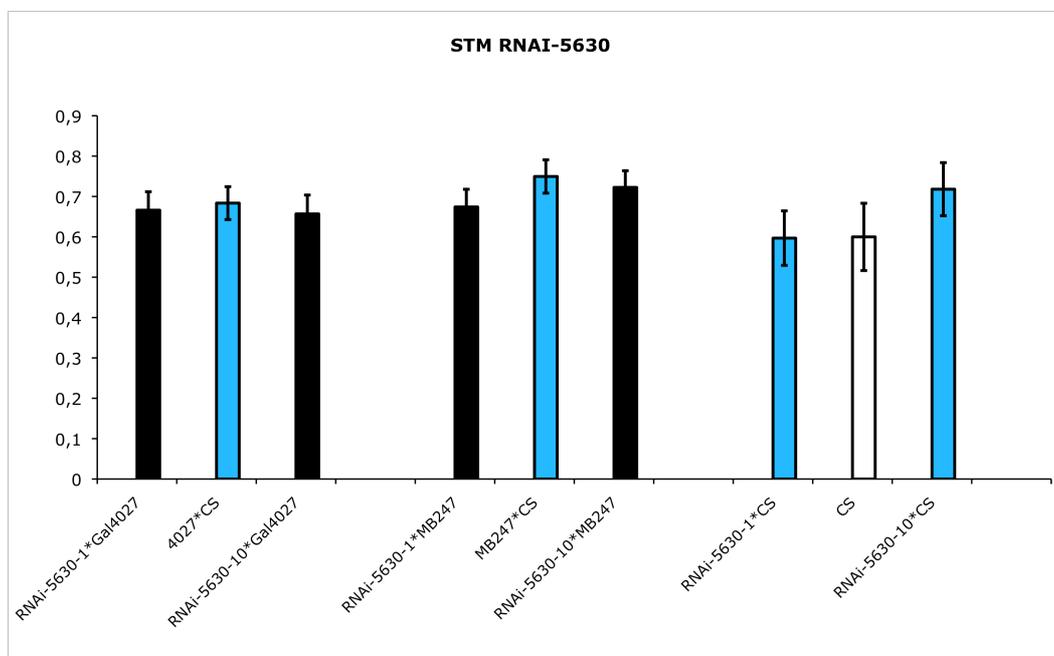
	test-t Vs RNAi*CS	test-t Vs MB*CS	test-t Vs 4027*CS	test-t Vs CS
5630-1*4027	0,000128929		0,00085321	9,20976E-05
5630-1*MB247	0,002473688	0,008437628		0,005714639
5630-6*4027	0,000363227		0,000321044	1,15297E-05
5630-6*MB247	0,001795117	0,020957557		3,22257E-05
5630-10*4027	0,004251468		0,020939268	0,001663403
5630-10*MB247	0,000257766	0,086059069		0,000158405

Figure 51 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi chez l'adulte et au cours du développement



Conditionnement 5 cycles massés, puis test à 24h; n=8 pour tous les génotypes. Aucune différence avec les contrôles.

Figure 52 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi chez l'adulte et au cours du développement

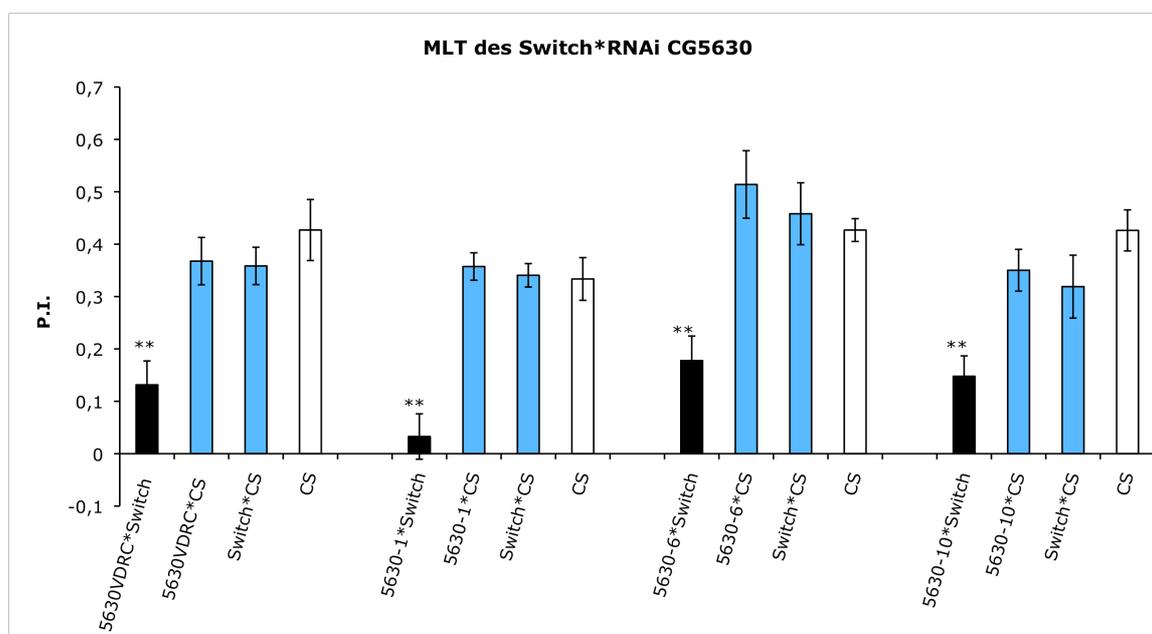


Conditionnement 1 cycle et test à 2h; n=6 pour tous les génotypes. Tous les scores sont équivalents. La MCT est donc normale

Pour valider l'hypothèse d'un rôle spécifique dans les processus mnésiques, et s'affranchir de problèmes développementaux subtils, nous avons spécifiquement induit à l'état adulte les RNAi. Le système gène switch développé par le groupe de R Davis, a été fait à partir du pilote d'expression MB247 et conduit ainsi à une expression dans les lobes α/β et γ de l'adulte lorsque les mouches se nourrissent sur un milieu contenant du RU486. Pour ces expériences, nous avons utilisé à la fois les RNAis que nous avons construits, ainsi que celui provenant du VDRC.

En comparant les scores des mouches *MB-Switch/RNAi* avec *MB-Switch/+*, *RNAi/+* et *CS*, nous observons quelles que soit les lignées utilisées une chute de mémoire spécifique de la MLT (figure 53 et tableau 2). MRA et MCT étant normales (figures 54 et 55).

Figure 53 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte

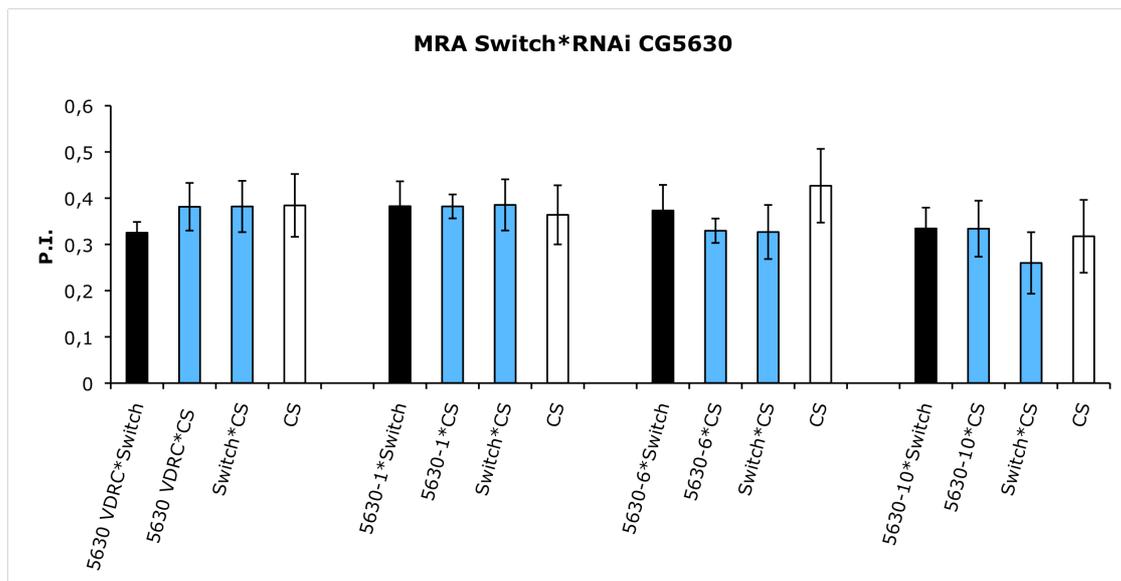


Après 2 jours sur milieux RU, conditionnement 5 cycles espacés, test à 24h. n=12-16 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=6 à 8 pour *Switch/CS* et *CS*.

Tableau 2 : Étude statistique des différences de résultat pour le RNAi contre CG5630

	test-T vs CS*RNAI	Test-T vs CS*Switch	Test-T vs CS
<i>5630 VDRC*Switch</i>	0,000913601	0,000748226	0,001104233
<i>5630-1*Switch</i>	4,74145E-06	1,2734E-05	0,000162929
<i>5630-6*Switch</i>	0,000419468	0,003277549	0,000236975
<i>5630-10*Switch</i>	0,001468916	0,039524898	0,000193232

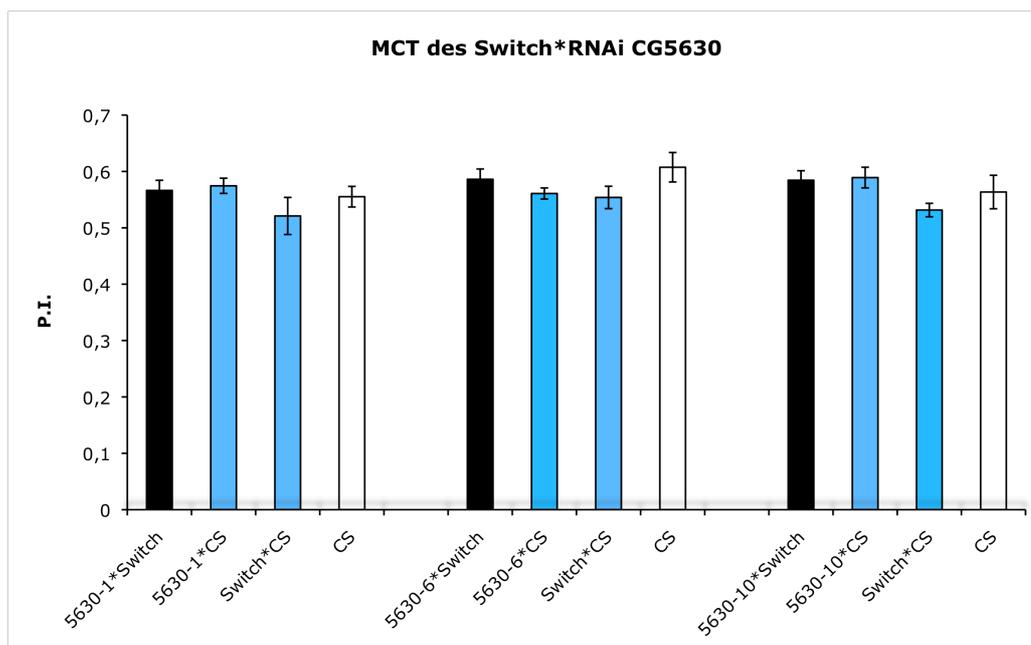
Figure 54 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte



Après 2 jours sur milieu RU, conditionnement 5 cycles massés, test à 24h. n=12-16 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=6 à 8 pour *Switch/CS* et *CS*.

	test-T vs CS*RNAi	Test-T vs CS*Switch	Test-T vs CS
<i>Swi*5630 VDRC</i>	0,332483889	0,369360686	0,410748561
<i>Sw*RNAi 5630-1</i>	0,994033819	0,972055685	0,826591865
<i>Sw*RNAi 5630-6</i>	0,486822465	0,573871072	0,593101921
<i>Sw*RNAi 5630-10</i>	0,994451204	0,375566958	0,856194932

Figure 55 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi uniquement à l'état adulte



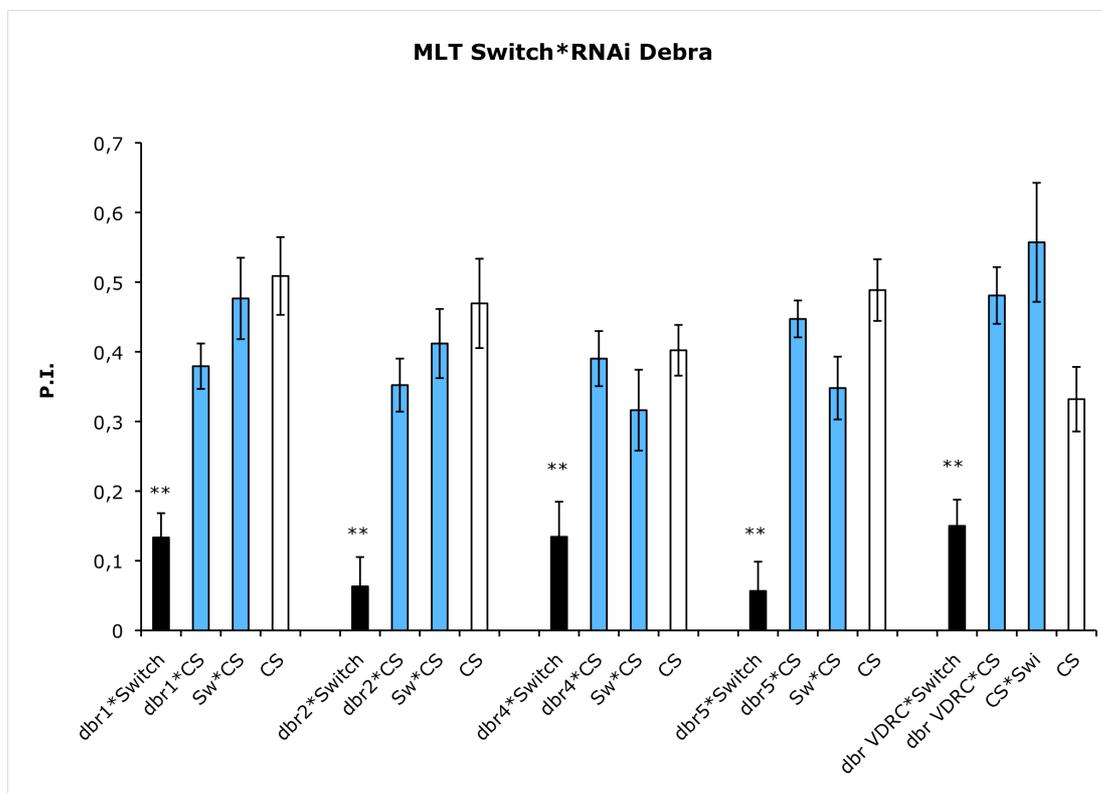
Après 2 jours sur RU, conditionnement 1 cycle et test à 2h ; n=9 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=5 pour *Switch/CS* et *CS*. Tous les scores sont équivalents.

1. Debra RNAi

Nous nous sommes affranchis des expériences où nous aurions pu conduire l'expression des RNAis dbr tout au long du développement. Nous les avons uniquement exprimés à l'état adulte via le système Gene-Switch. Nous avons dans un premier temps étudié la MLT, et ainsi observé une chute significative de la mémoire (figure 56 et tableau 3) pour nos 4 constructions ainsi que celle provenant de VDRC.

Nous avons ensuite vérifié que cette chute de mémoire est spécifique de la MLT. Nous avons donc ensuite testé la MRA et la MCT. Bien que nous n'ayons pas testé toutes les constructions, nous n'observons aucune chute de mémoire (figures 57 et 58).

Figure 56 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte



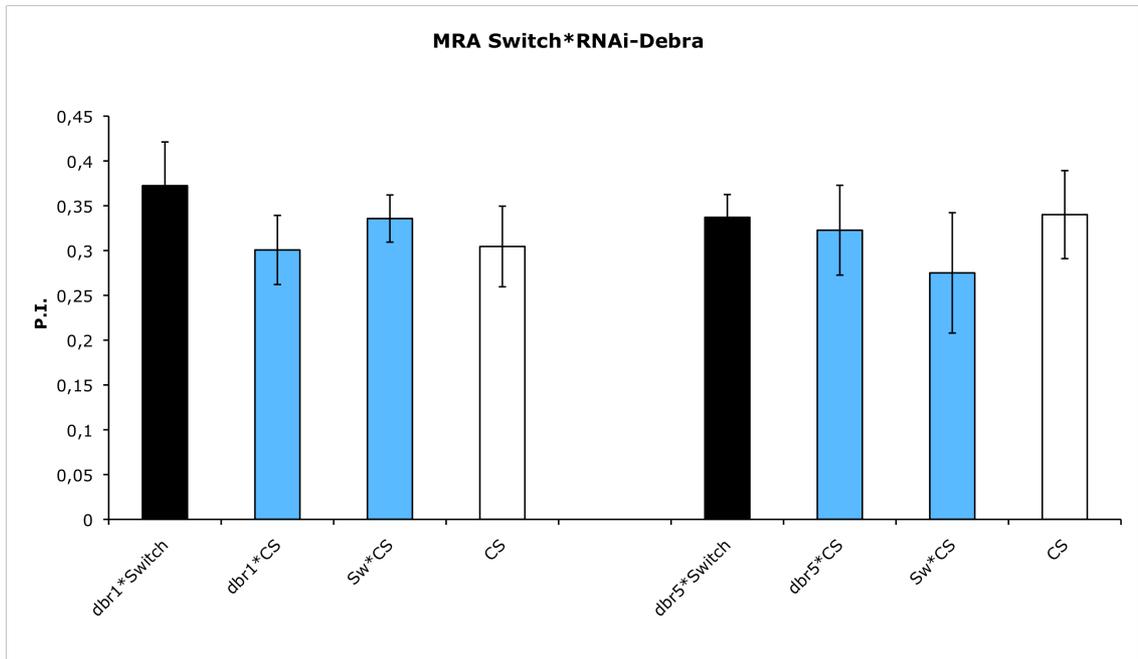
Après 2 jours passés sur milieu RU, conditionnement 5 cycles espacés, test à 24h n=16-18 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=8 à 9 pour *Switch/CS* et *CS*.

Tableau 3 : Étude statistique des différences de résultat pour le RNAi *dbr*

	test-t vs CS*RNAi	test-t vs CS*Switch	test-t vs CS
<i>dbr1*Switch</i>	1,56722E-05	0,000134916	3,31681E-05
<i>dbr2*Switch</i>	2,25909E-05	3,06665E-05	6,58639E-05
<i>dbr4*Switch</i>	0,000462794	0,028093435	0,000266786
<i>dbr5*Switch</i>	7,96E-08	0,000144585	8,98E-07
<i>dbr VDRC*Switch</i>	9,83359E-07	0,00108376	0,006839338

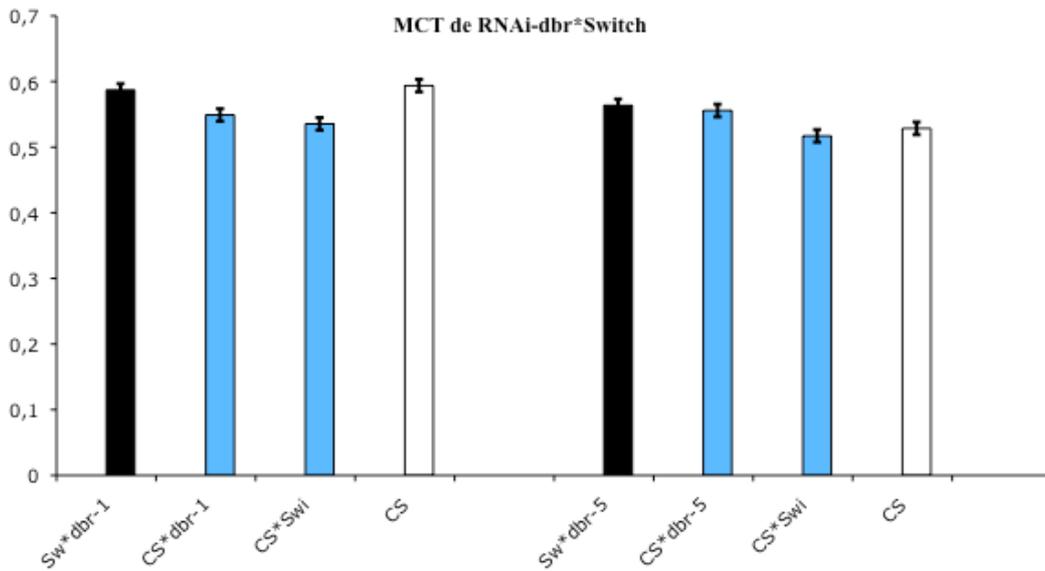
La chute de mémoire observée après un apprentissage de 5 cycles espacés à 24h est significative par rapport aux contrôles.

Figure 57 : Étude de MRA chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte



Après 2 jours sur milieu RU, conditionnement 5 cycles massés, test à 24h ; n=10-14 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=5 à 7 pour *Switch/CS* et *CS*. Il n'y a aucune différence statistique entre *Switch*RNAi* et les contrôles ; la MRA est normale

Figure 58 : Étude de la MCT chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte



Après 2 jours sur RU, puis conditionnement 1 cycle et test à 2h ; n=9-10 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=5 pour *Switch/CS* et *CS*. Tous les scores sont équivalents.

3. Contrôle des expériences switch

Nous avons finalement vérifié nos expériences de MLT en switch avec les RNAi par une dernière expérience. Il s'agissait de s'assurer que c'était bien l'induction du RNAi par l'ingestion de drogue qui induisait la chute de mémoire observée 24h après un protocole espacé. Nous avons donc comparé les scores entre des individus *MB-Swith*RNAi* sur milieu normal, avec des individus *MB-Swith*RNAi* sur un milieu contenant le RU486 (figure 59) Nous avons ensuite comparé statistiquement la différence entre les groupes *MB-Swith*RNAi* ayant passé 2 jours sur un milieu avec du RU ou non. Dans tous les cas, les scores de ces groupes sont statistiquement différents (tableau4).

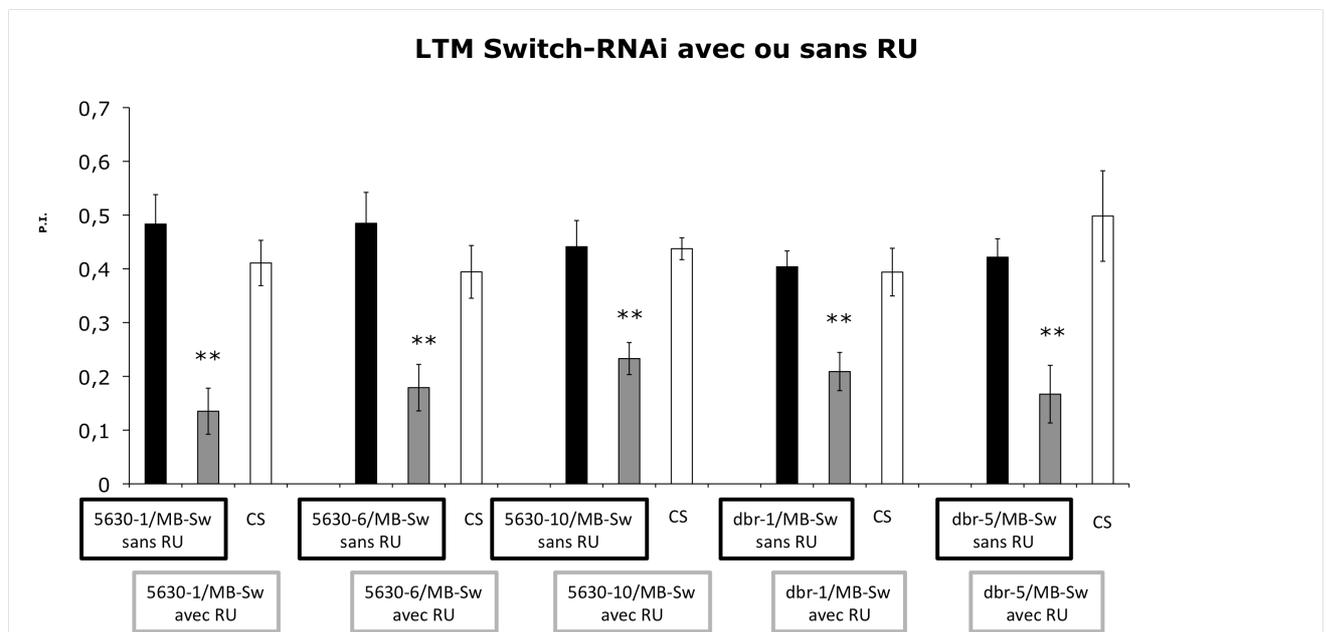


Figure 59 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le RNAi de *dbr* uniquement à l'état adulte avec ou sans RU

Après 2 jours passés sur un milieu avec du RU ou non, conditionnement 5 cycles espacés, test à 24h. En noir les groupes ayant passés 2 jours sur un milieu normal ; en gris foncé les groupes ayant passés 2 jours sur un milieu avec du RU ; en blanc les contrôles CS. n=8 pour les *MB-Swith/RNAi-5630* ; n=10 pour *MB-Swith/RNAi-Dbr*, n=8 pour les CS.

Tableau 4 : Étude statistique des différences de résultat pour le RNAi *dbr* avec ou sans RU.

	test-t par rapport au contrôle du même génotype sans RU
<i>Sw*56-1 avec RU</i>	0,000226564
<i>Sw*56-6 avec RU</i>	0,000958153
<i>Sw*56-10 avec RU</i>	0,00353689
<i>Sw*RNAi-Dbr 1 avec RU</i>	0,000553983
<i>Sw*RNAi-Dbr 5 avec RU</i>	0,001111176

4. Sur-expression de la protéine

Pour affiner notre étude comportementale du gène Debra et de son rôle dans la mise en place de la MLT, nous avons également procédé à l'analyse de la mémoire dans le cadre de la sur expression de la protéine Debra. Nous avons ainsi fusionné en aval d'un promoteur UAS, au sein d'un vecteur pCasper-UAS. La construction a été envoyée à séquencer pour s'assurer de l'intégrité du fragment inséré. Ces constructions ont ensuite été envoyées pour injection chez theBestGene. Nous avons testé 3 insertions différentes.

Nous avons tout d'abord conduit l'expression dans le CPs et au cours du développement en utilisant les pilotes d'expression MB247 et 72Y (figure 60 et tableau 5).

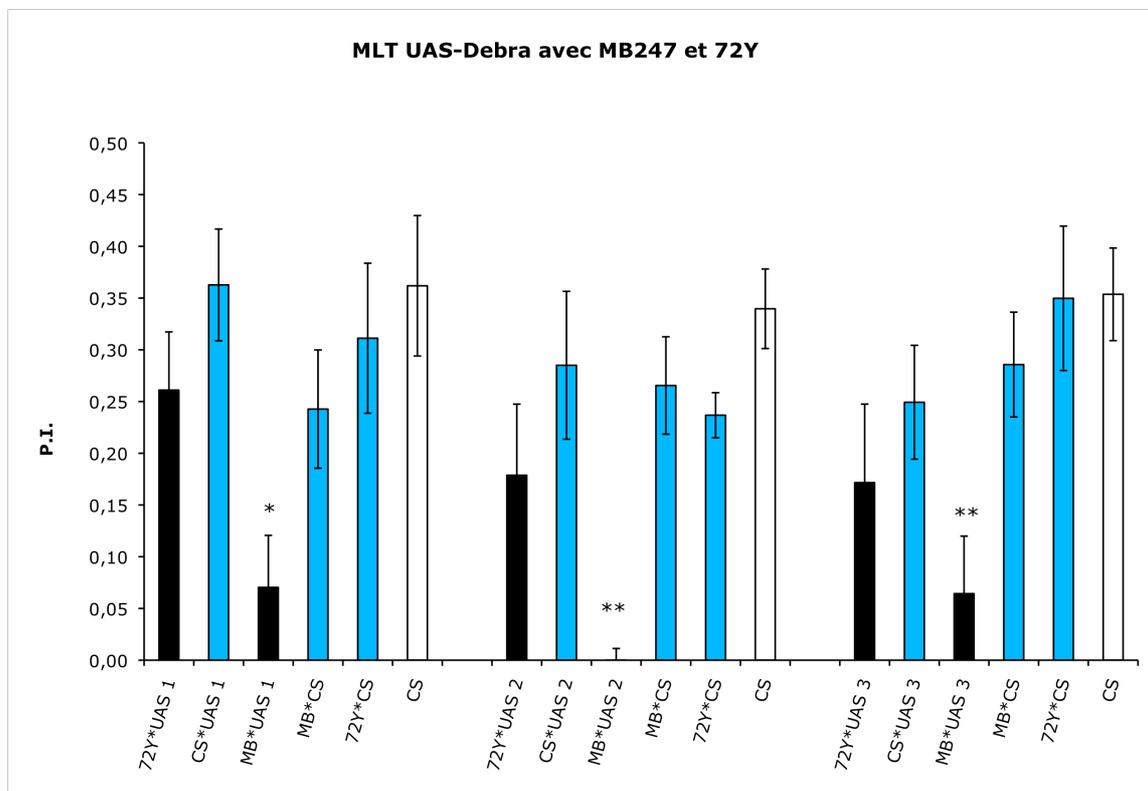


Figure 60 : Étude comportementale lors de la sur expression de Debra tout au long du développement et chez l'adulte

Les scores sont calculés 24h après un conditionnement de 5 cycles espacés. En conduisant la surexpression uniquement dans les neurones déterminés par le pilote d'expression 72Y, nous observons une diminution non significative des scores de mémoire. En conduisant cette expression avec MB247, nous observons une chute significative des scores de mémoire. N=8 pour tous les génotypes.

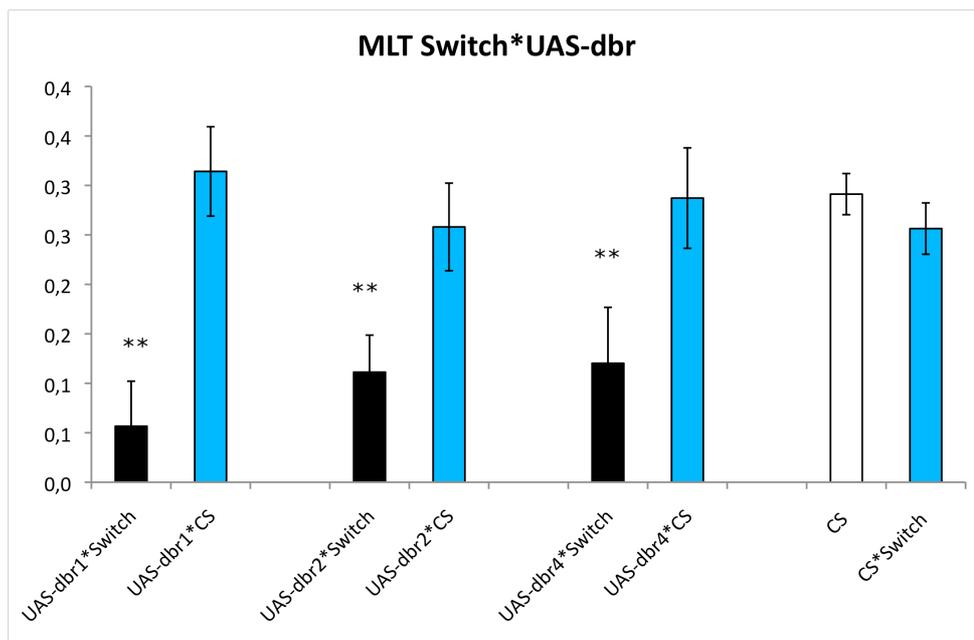
Tableau 5 : Étude statistique des lors de la sur-expression de debra

génotype	test-t vs CS	test-t vs 72*CS	test-t vs MB*CS
UAS 1*72Y	0,07362	0,25762	
UAS 1*MB247	0,00206		0,01564
UAS 2*72Y	0,01716	0,05496	
UAS 2*MB247	0,00092		0,00528
UAS 3*72Y	0,07630	0,18786	
UAS 3*MB247	0,00130		0,00837

Sur-exprimer la protéine Debra dans les neurones où elle est censé être exprimée, via le pilote d'expression 72Y (lobes α/β), conduit à des scores de mémoire 24h après un conditionnement espacé, très légèrement inférieurs aux contrôles (72Y*UAS contre 72Y*CS). Ils ne présentent néanmoins pas de différence statistique avec les contrôles. Par contre si la protéine est exprimée dans les lobes α/β et γ , la chute des scores de mémoire est drastique. Nous observons alors des scores proche de 0.

Observant une nette chute uniquement avec les promoteurs MB247, nous avons conduit la sur-expression de la protéine uniquement à l'état adulte dans les CPs via le système gene-switch. Nous avons observé une chute de la MLT significative par rapport aux différents contrôles utilisés (figure 61 et tableau 6).

Figure 61 : Étude de la mémoire à long terme chez des individus exprimant le l'UAS de *dbr* uniquement à l'état adulte :



Après 2 jours passés sur milieu RU, les drosophiles subissent le protocole d'apprentissage espacé, et sont testées 24h plus tard. N=18 pour les Switch*UAS, et CS*UAS ; N=35 pour les contrôles.

Tableau 6 : Analyse statistique dans le cadre de la MLT

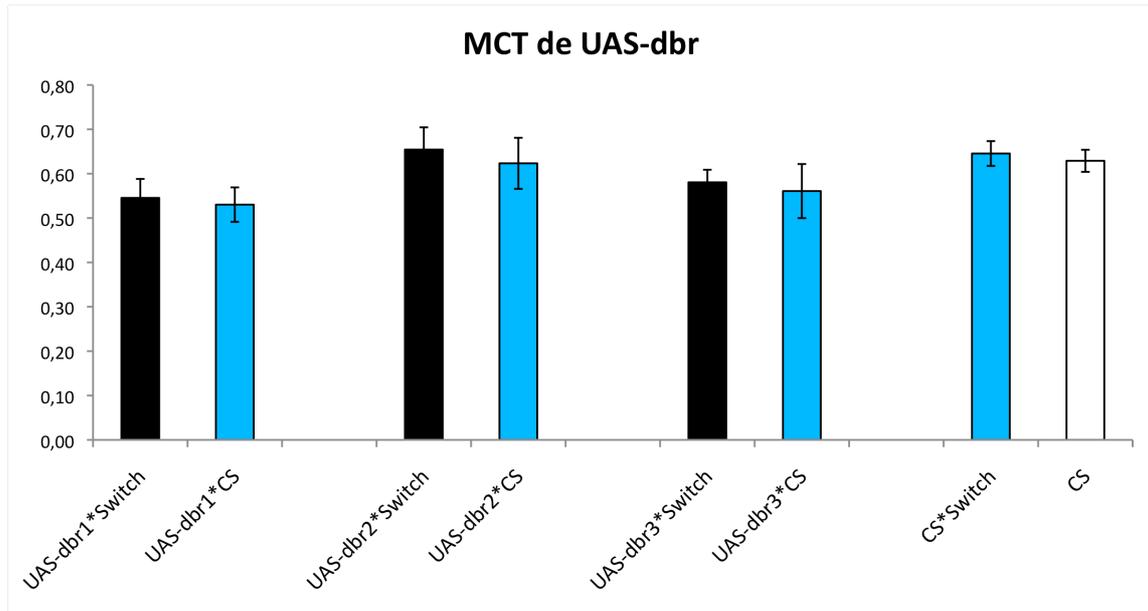
	test-t vs CS	test-t vs CS/Switch	tes-t vsCS/X
SW*UAS-72Y 1	8,89572E-05	0,000669426	0,000307067
SW*UAS-72Y 2	0,000245116	0,003049559	0,016243601
SW*UAS-72Y 4	0,009608934	0,038299833	0,035134949

Puis nous avons vérifié que la MRA (figure 62), la MCT (figure 63) étaient normales.

Figure 62 : Étude de MRA chez des individus exprimant l'UAS uniquement à l'état adulte

Après 2 jours sur milieu RU, conditionnement 5 cycles massés, test à 24h ; n=14 pour les *MB-Switch/UAS* et *MB-Switch/CS* ; et n= 7 pour *Switch/CS* et *CS*.

Figure 63 : Étude de la MCT chez des individus surexprimant dbr uniquement à l'état adulte



Après 2 jours sur RU, puis conditionnement 1 cycle et test à 2h ; n=10-11 pour les *MB-Switch/RNAi* et *MB-Switch/CS* ; et n=5-6 pour *Switch/CS* et *CS*. Tous les scores sont équivalents.

5. Les contrôles comportementaux

Nous avons affiné notre étude de ces mutants en analysant leurs sensibilités olfactives, ainsi que leur sensibilité aux chocs électriques. Ni les RNAis contre Debra, ni ceux contre CG5630 ne présentent de défaut. Il s'agit donc de mutants spécifiques de la MLT.

a) Sensibilité aux chocs électriques :

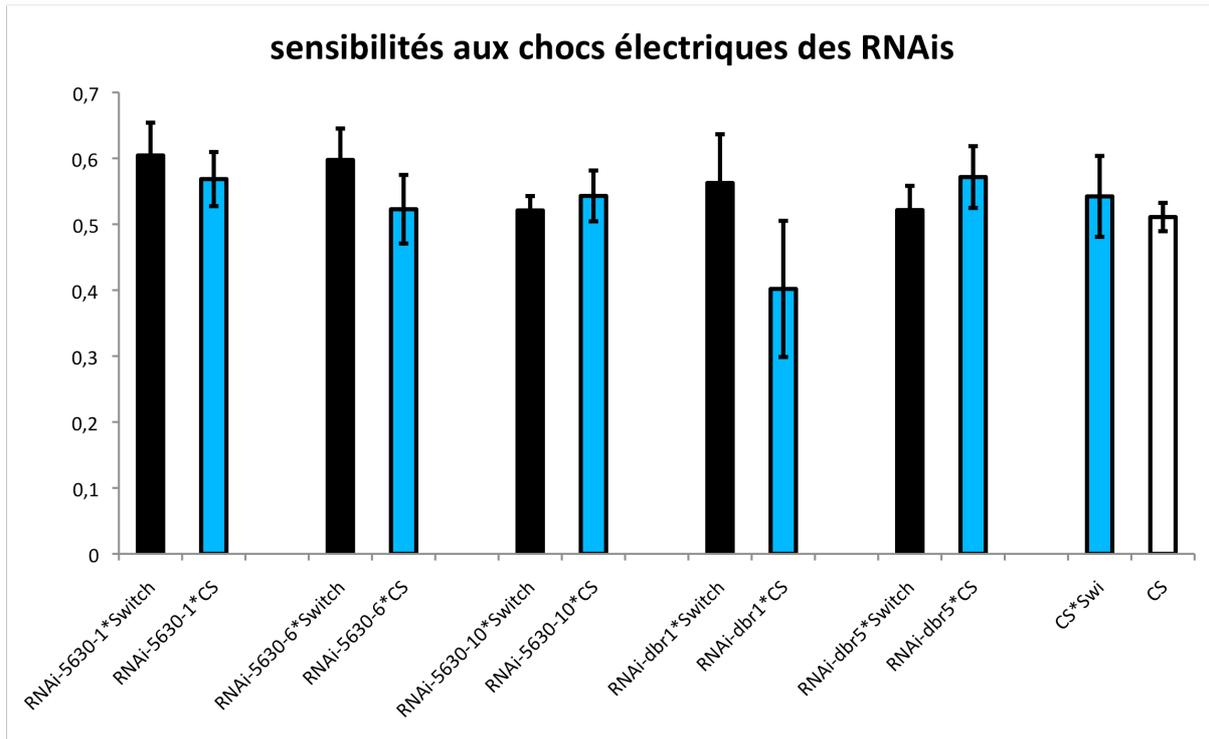


Figure 64 : étude de la sensibilité aux chocs électriques chez les individus exprimant les RNAis uniquement à l'état adulte

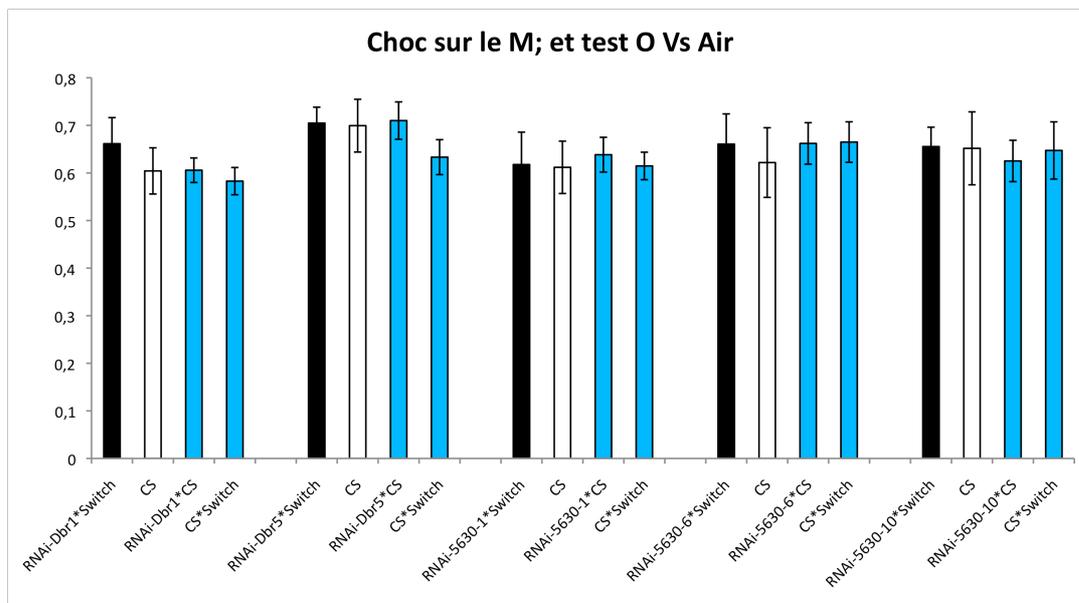
Après 2 jours passés sur milieux RU, les mouches ont 1 minute pour choisir entre 2 barillets, l'un étant parcouru par un courant électrique l'autre non. Il n'y a pas de différence significative, entre les *MB-Switch*RNAi* et les contrôles. N=8 pour chaque colonne.

Switch à l'état hétérozygote ne conduit pas à une perte de sensibilité aux chocs électriques. Mis à part des scores plus faibles, mais non significatifs pour le génotype *RNAi-Dbr1*CS*, tous les autres groupes présentent des résultats proches de ceux des contrôles (figure 64). En effet *MB-Switch*RNAi-Dbr1* a des scores statistiquement identiques à ceux de *CS* et de *CS*MBSwitch*. Ainsi cette chute observée est certainement due à un problème au cours de l'expérience, car aucun des allèles ne semble induire de problème de sensibilité.

b) Étude de l'olfaction

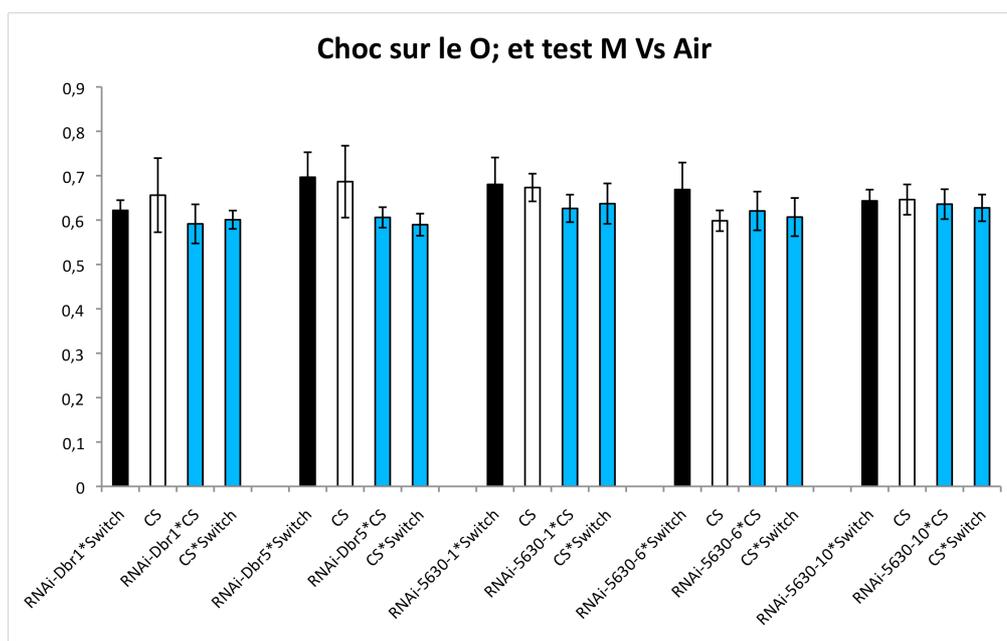
Quelle que soit l'odeur associée aux chocs électriques, il n'y a ensuite aucun défaut olfactif observé (figures 65 et 66). Pour tous les génotypes, nous observons des résultats identiques à ceux des contrôles.

Figure 65 : Étude de l'olfaction, et de la sensibilité au MCH



Les mouches subissent l'association de MCH et d'un choc électrique. Tout de suite après, un flux d'air et un flux d'octanol leur sont présentés. Les scores sont calculés comme s'ils s'agissaient d'index de performance. Nous n'observons pas de différence significative entre les groupes ; n=8-10 pour chaque groupe.

Figure 66 : Étude de l'olfaction, et de la sensibilité à l'Octanol



Les mouches subissent l'association de Oct et d'un choc électrique. Tout de suite après, un flux d'air et un flux de MCH leur sont présentés. Les scores sont calculés comme s'ils s'agissaient d'index de performance. Nous n'observons pas différence significative entre les groupes ; n=8-10 pour chaque groupe.

IX Western blot

Pour nous assurer de l'exactitude de nos résultats, et dans la mesure où une étude sur le gène Debra avait déjà été menée, nous nous sommes efforcés de contrôler l'efficacité de nos constructions. Pour cela nous avons procédé à un western blot où nous utilisons un anticorps dirigé contre la protéine Debra généreusement offert par le laboratoire de Dai (Dai, Akimaru et al., 2003). Nous avons contrôlé la quantité de protéine présente chez des individus exprimant le RNAi, et l'UAS sous le contrôle du pilote d'expression OK107, ainsi que de la souche référence CS. L'extraction des protéines ne s'est effectuée que sur les têtes des individus. Les résultats sont présentés sur la figure 67.

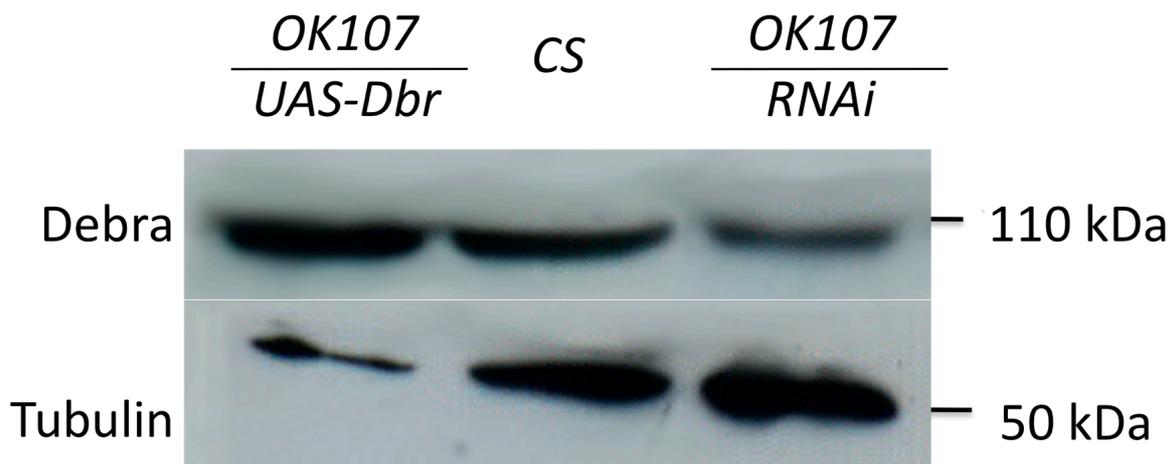


Figure 67 : western blot sur des extraits de tête de mouche :

*UAS-Debra*OK107* ; *CS* ; *RNAi-Debra*OK107*. Nous observons une bande de taille attendue aux alentours de 100kDa pour Debra. Le contrôle est la protéine tubuline. Il y a une augmentation de la quantité de debra chez l'UAS ; et à contrario, une diminution chez le RNAi par rapport à la souche CS.

Bien que la quantité de tubuline dans le puit *OK107*RNAi* semble légèrement plus importante que dans le puit *CS*, la quantité de protéine Debra y est moindre. Ainsi notre construction RNAi qui tend à faire diminuer la quantité de protéine fonctionne correctement.

Quant à la construction UAS, nous observons qu'il n'y a pas beaucoup de tubuline dans le puit *OK107*UAS* par rapport au contrôle. Néanmoins la quantité de protéine Debra y est largement supérieure.

Ainsi nos constructions donnent bien le phénotype attendu, ce qui nous permet d'être sûrs des effets observés en comportement.

DISCUSSION

Ce travail a ainsi permis de découvrir deux nouveaux mutants spécifiques de la MLT. En exprimant des RNAs contre les gènes affectés par les mutations au sein de la souche mutante, uniquement à l'état adulte au sein des CPs, nous avons réussi à empêcher la formation de MLT, sans pour autant affecter les autres phases de mémoire, ou leur sensibilité aux différents stimuli. Néanmoins les questions restent nombreuses quant à leur rôle et leurs fonctions potentielles lors de la mise en place de la MLT.

Le mutant Gal 4027

Le premier de ces gènes est CG5630. Aucune référence bibliographique, ni aucune analogie de séquence n'est retrouvée sur ce gène. Nous ne pouvons hypothéquer de sa fonction biologique. Mais aujourd'hui plusieurs banques de données existent répertorient les interactions théoriques ou avérées du génome et du protéome drosophilien. Un site internet, <http://proteome.wayne.edu/PIMdb.html>, répertorie les interactions réelles et vérifiées ainsi que les prédictions d'interaction basées sur les données des gènes orthologues. En 2001, plusieurs équipes se sont associées pour procéder à une large étude des protéines du génome drosophilien. En association avec la compagnie Curagen, ils ont alors récupéré plus de 10000 transcrits et procédé à l'analyse de plus de 7000 protéines. En les recombinant, et en utilisant la technique de double hybride, ils ont pu mettre en évidence des interactions entre protéines, et ainsi observer quelles protéines s'associaient, ou interagissaient avec telle protéine (Giot et al., 2001). La banque de données BOND pour sa part répertorie les interactions entre les protéines en se basant sur des expériences entre les orthologues humains des protéines de drosophile. Les interactions génétiques sont quant à elles accessibles sur le site www.flybase.org. Nous avons ainsi accès à une somme de données qui nous permet d'envisager de nouveaux axes d'études pour les gènes nouvellement identifiés.

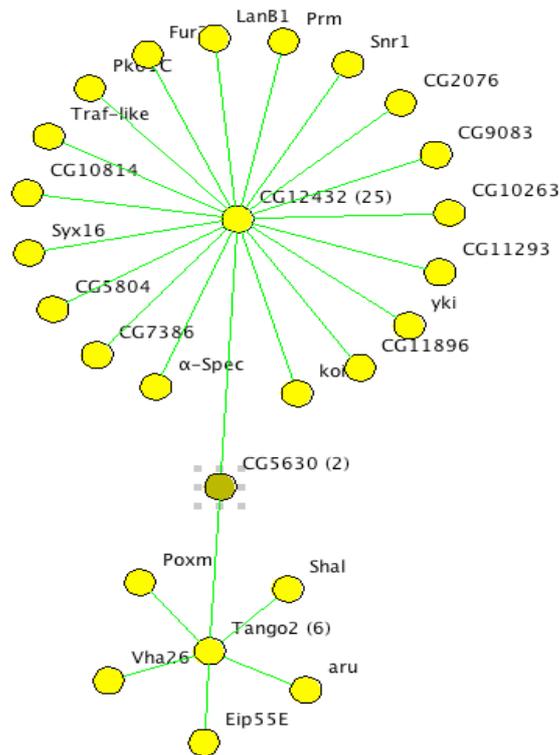


Figure 68 : Diagramme des interactions supposées de CG5630 avec CG12432, et Tango2 avec d'autres gènes.

L'ensemble de ces résultats provient de la banque de données Curagen. Il ne s'agit que d'interactions protéine-protéine avérées dans une étude double hybride chez la levure.

CG5630 semble interagir avec les gènes Tango2 et CG12432 (figure 68). Or parmi les gènes potentiellement intéressants qui ont une interaction avec ces deux gènes seul *Shal* semble sortir du lot. Il s'agit d'un gène codant un canal potassique exprimé au sein des CPs dont les mutations causent des troubles d'excitabilité des neurones, de plasticité synaptique, mais également de mémoire olfactive (Gasque, G., P. Labarca, et al., 2005).

Gal 4027 à l'état hétérozygote ne présente pas de défaut mnésique. Nous pourrions tester dans un premier temps l'interaction de CG5630 avec *Shal* dans un contexte de double hétérozygote et voir si un défaut apparaît.

Le second gène est *dbr*. Il a été précédemment décrit et caractérisé comme un facteur présent dans la voie métabolique de Hedgehog (Hh), et cela dans le cadre d'étude au sein des disques imaginaux (Dai et al., 2003). Ci, cubitus interruptus, est un facteur de transcription impliqué dans la voie Hh. Il existe sous deux formes principales. Une forme native appelée Ci155 ou active présente dans les cellules recevant le signal Hh, et une autre forme appelée Ci75 ou répressive qui elle est présente dans les cellules qui ne reçoivent pas le signal hh (Aza-Blanc et al., 1997; Chen et al., 1999) .

Il existe au sein des disques imaginaux 2 types de compartiments donnant lieu à 2 types de cellules :

- Les cellules P qui expriment *engrailed* et qui ne sont pas sensibles (« refractory ») aux signaux de la voie *Hh*.
- Les cellules A qui n'expriment pas *engrailed* et qui sont capables de répondre aux signaux *Hh*.

En absence de Hh, Patched (*ptc*), une protéine transmembranaire (Lum and Beachy, 2004), empêche Smoothened (*smo*), une autre protéine transmembranaire mais couplée à une protéine G (Alcedo et al. 1996), d'activer les composants en aval dans la voie de signalisation. Ci est alors associé au sein de la cellule à un complexe protéique comprenant notamment Costal-2 (*cos2*) une protéine liée aux microtubules, Fused (*Fu*) une sérine/thréonine kinase, Supressor of fused (*Su(fu)*) une protéine d'échaffaudage. En absence de signal hh, la protéine membranaire *ptc* empêche *smo* d'activer ses partenaires. La protéine Ci155 est alors phosphorylée par plusieurs kinases (dont Ck1, Gsk3, et la PKA) et fait également intervenir Cos2 (Price and Kalderon, 2002; Zhang et al., 2005). Ci155 est alors dégradé par le protéasome en une forme plus courte Ci75.

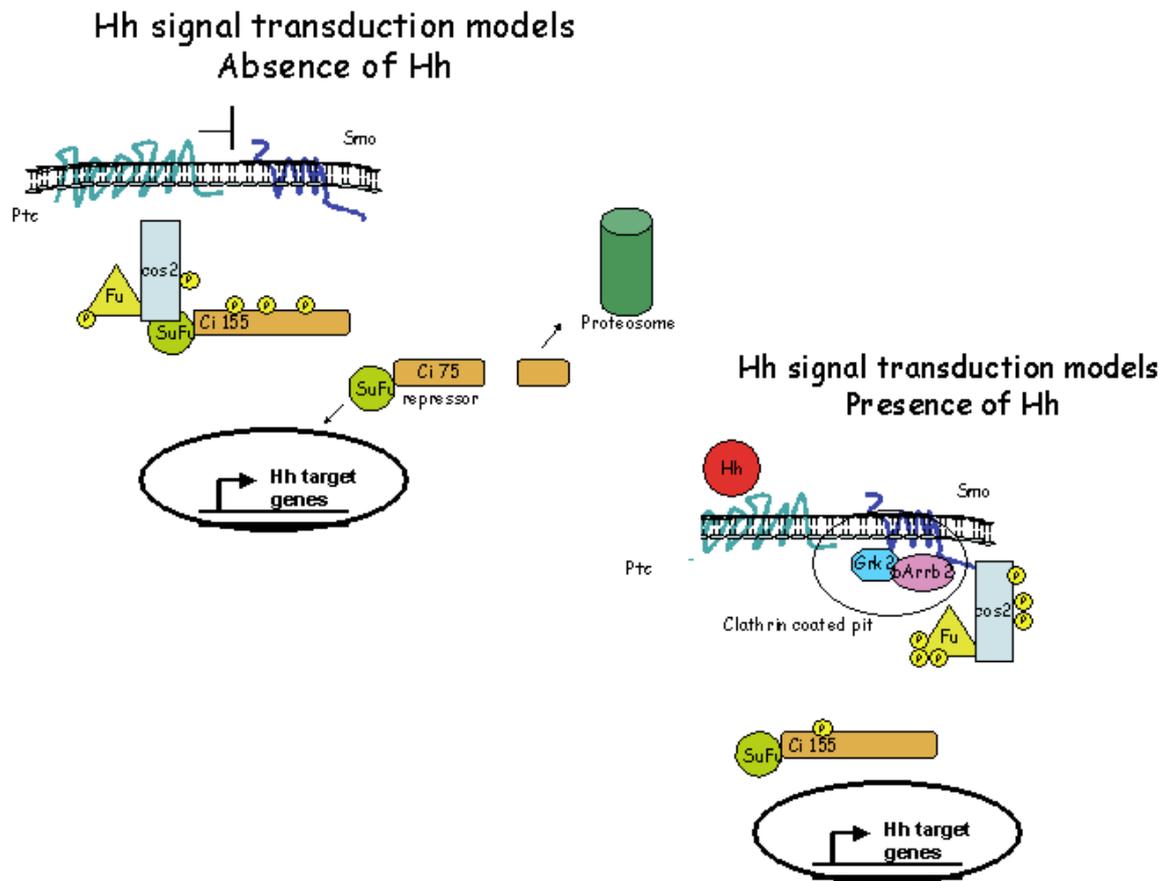


Figure 69 : Devenir de Ci en fonction de la présence de signal Hh.

En absence de signal Hh, Ci155 est lié à un complexe protéique comprenant Fu, Cos2, et Su(fu). Ci est phosphorylé. Sans activation, il est dégradé par le protéasome en une forme répressive Ci75, et n'active ainsi pas les gènes cibles. Par contre en présence du signal Hh, ptc et smo se séparent permettant à ce dernier d'activer différents partenaires dont Grk2 et Arrb2. Ci155 n'est plus complexé avec Fu, et Cos2, pénètre alors le noyau et active les cibles de la voie de signalisation Hh. Image du site <http://hedgehog.sfsu.edu/>.

En présence du signal hh, smo est phosphorylée par une prot G couplée à une kinase Grk2 (Chen et al., 2004; Ogden et al., 2004). Cette phosphorylation change sa conformation, ce qui lève son inhibition sur ptc. Il y a formation d'un complexe au sein de la cellule faisant intervenir plusieurs partenaires dont Cos2, Fu, Su(Fu), et Ci (Lum et al., 2003). Fu se retrouve hyper-phosphorylée ce qui a pour conséquence de lever l'inhibition de la protéolyse de Ci (Aza-Blanc et al., 1997; Price and Kalderon, 2002; Zhang et al., 2005). Ci155 est alors capable d'activer l'expression de gène cibles en entrant dans le noyau.

Pour résumer sans signal hh, Ci155 est dégradé en Ci75 par le protéasome et ne peut activer les gènes en aval. Par contre, en présence de hh, il y a inhibition de cette dégradation et Ci peut activer ses cibles. La figure 69 résume le devenir de Ci en fonction de la présence ou non de Hh.

Mais ce que Dai et ses collègues ont montré en découvrant *dbr*, c'est qu'une troisième possibilité existait. En effet ils ont démontré que Dbr médie la dégradation de Ci155 sans donner lieu à la forme tronquée Ci75, inhibant ainsi l'expression des gènes cibles de cette voie. Pour cela plusieurs conditions sont nécessaires. En premier lieu Ci doit être phosphorylé par la PKA. Il y a ensuite formation d'un complexe entre la forme poly-phosphorylée de Ci avec Slimb une protéine ligase et Dbr. Dbr se fixe sur via son extrémité N-term sur la région en doigt de zinc de Ci. Il y a alors addition d'ubiquitin sur Ci155 qui est alors internalisé dans des lysosomes et dégradé (figure 70).

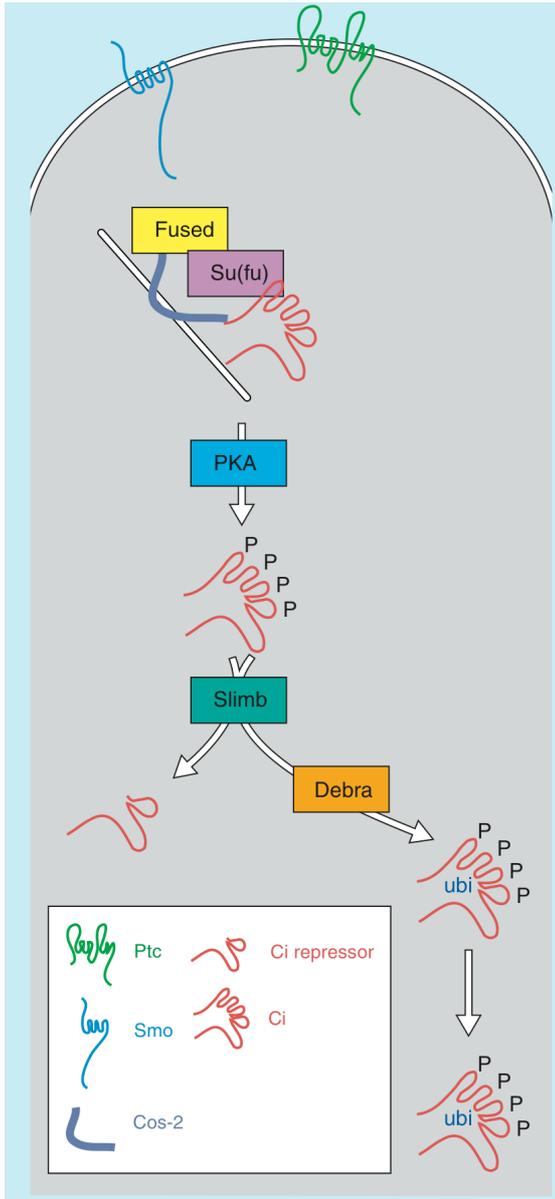


Figure 70 : Éléments clés de la voie de signalisation Hh, et intervention de Dbr.

En absence de signal Hh, Cos2, Fu, Sufu et Ci sont présents au sein du cytoplasme sous forme d'un complexe protéique lié au cytosquelette. Ci est directement ciblé par la PKA pour être phosphorylé. Le produit est alors soit clivé par protéolyse et donne la forme répressive de Ci ce qui nécessite l'intervention de Slimb, soit dégradé via une poly-ubiquitination par Dbr.

(Marcel van den Heuvel, 2003)

Bilan des propriétés de Dbr (figure 82)

- Ci155, Dbr et Slimb forment un complexe. Les 243 premiers acides aminés de Dbr se lient à la région en doigt de zinc de Ci.
- Dbr fait baisser la quantité de Ci155 mais sans générer le passage de la forme active à la forme répressive.
- Dbr inhibe l'expression des gènes cibles de la voie Hh.
- Dbr médie la dégradation de Ci en impliquant Slimb et la phosphorylation de Ci PKA.
- Dbr et Slimb induisent de manière coopérative la poly-ubiquitination de Ci155.
- Dbr se trouve dans les multivesicular-body (il s'agit d'endosomes formés par l'invagination de la membrane, où les protéines sont alors séquestrées en vue d'une dégradation).

Dbr semble être donc un facteur nécessaire à la dégradation de certaines molécules. Il est intéressant de noter que pour cela Dbr a besoin de l'action préalable de la PKA pour phosphoryler la cible, et de Slimb. Or il s'agit de 2 gènes mis en évidence pour leur rôle dans la mise en place de la mémoire. La PKA est connu pour être un élément central, comme nous l'avons vu dans la 1^{ère} partie, dans la mise en place de la mémoire en jouant sur les niveaux d'AMPc. Quant à Slimb, il s'agit d'une « ubiquitin-protein ligase », une protéine qui permet de lier des molécules d'ubiquitine sur des protéines, impliquée dans de multiple processus biologique dont le rythme circadien (Grima et al., 2002) mais également l'apprentissage olfactif (Dubnau et al., 2003). En effet, en 2003, Dubnau et ses collaborateurs ont effectué un crible pour trouver de nouveaux mutants de mémoire. Ils ont ainsi découvert qu'une mutation au sein du gène *slimb* générerait des défauts de comportement en particulier pour la MLT. De plus ce gène est également exprimé au niveau des CPs. Enfin diverses études ont montré un rôle de *slimb* dans les régulations des voies métaboliques de Wingless (Potter and Xu, 2001), et de Hedgehog (Jiang and Struhl ; 1998).

Intéractions potentielles de *dbr*

D'après Curagen, *Dbr* interagit faiblement (0,48 sur une échelle de 1) avec un gène nommé *Ets97D*, alias CG6338. D'après sa séquence, il semblerait qu'il s'agisse d'une protéine de liaison à l'ADN, ou/et qui supporterait une activité de facteur de transcription. Ce gène semblerait impliqué dans la localisation de l'RNAm d'*oskar* (Martin et al., 2003). Il semblerait également capable de moduler la transcription de l'ARN pol 2. Or ce gène *oskar* est sorti du crible comportemental réalisé par l'équipe de Dubnau en 2003. Il s'agit d'un gène impliqué dans la translocation de l'RNAm (Micklem et al., 2000). Ce résultat suggérerait que le transport de nouveaux RNAm et leurs régulations locales sont requises pour la mise en place de la MLT. *Ets97D* contribuerait au contrôle de l'expression du gène *oskar*, et pourrait être lui-même régulé par *dbr*.

De plus, selon FlyBase, *Ets97D* aurait des interactions génétiques avec 2 autres gènes : *slbo* et *capu*. *Slbo* pour slow-border-cell, qui est impliqué dans les processus de migration de cellules folliculaires, et est mentionné dans deux articles intéressants. Dans le 1^{er}, il est suggéré une interaction génétique entre *slbo* et *slimb* (Muzzopappa et al., 2005), et dans le second l'RNAm de *slbo* varie après conditionnement espacé par RTqPCR (Dubnau et al., 2003). Ce résultat laisse à penser qu'une possible régulation dudit gène pour la mise en place de la MLT est nécessaire. Quant à *capu*, *cappuccino*, CG3399, il s'agit d'un gène impliqué dans la réorganisation du cytosquelette, opération nécessaire lors de l'établissement de nouvelles connections synaptiques (Goldstein et al., 2000).

Enfin, la dernière interaction potentiellement très intéressante est celle liant *Ets97D* à *CrebB-17A*. Bien qu'il s'agisse des interactions entre les orthologues humains de ces gènes, il est tout de même intéressant de noter que *dbr* peut être lié à *Creb*, facteur de transcription impliqué dans la mémoire à long terme (Tully et al., 1998).

L'ensemble de ces interactions est représenté sur la figure 71.

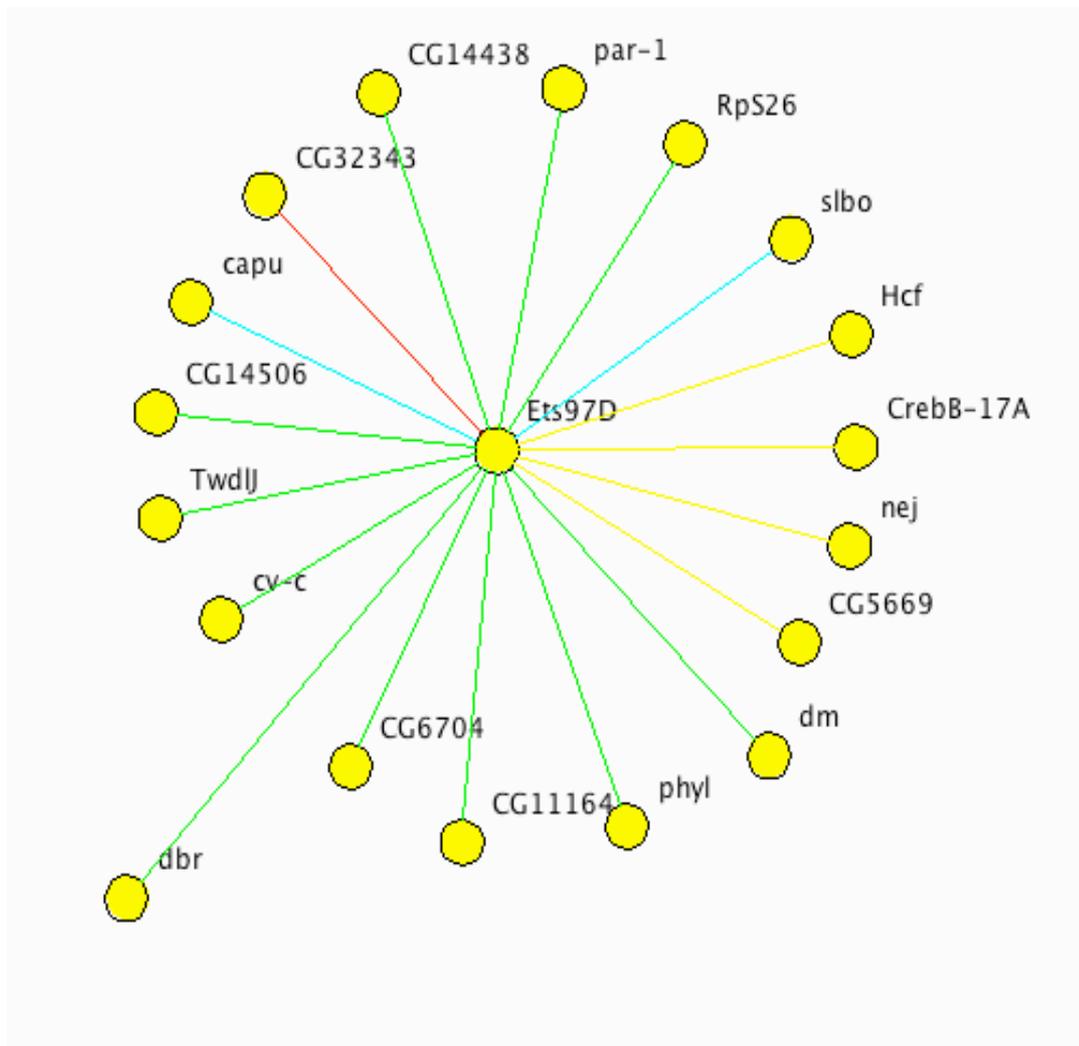


Figure 71 : Diagramme des interactions supposées de *dbr* avec *Ets97D*, et de *Ets97D* avec d'autres gènes.

En vert les interactions selon Curagen ; en bleu les interactions génétiques ; en jaune les prédictions d'après les interactions entre les orthologues humains.

Nous voyons aux travers de ces interactions potentielles que *dbr* est connecté à de nombreux gènes dont le rôle dans la MLT est déjà avéré, que ce soit *slimb* mutant de MLT, ou *slbo* dont l'RNAm varie après un conditionnement espacé (Dubnau et al., 2003). Bien que certaines de ces interactions ne soient que théoriques et que le lien entre *dbr* et *Ets97D* soit à la limite du seuil de confiance, il est néanmoins intéressant de noter que nous retrouvons des gènes au rôle déjà établi dans la mémoire. Ces informations laissent à penser que *dbr* a un rôle important dans la mise en place de MLT. En effet, celle-ci nécessite l'expression *de novo* de protéines (Tully & Preat 1994). *Tequila* (Didelot et al., 2006) et *Crammer* (Comas et al., 2004), qui sont deux mutants spécifiques de cette phase de mémoire, dont les gènes affectés présentent à l'état sauvage des variations transitoires de leur RNAm après conditionnement, laissant supposer qu'ils ont un rôle précis à un moment donné dans la mise en place de la mémoire à long terme. Or leurs fonctions sont pour le premier de catalyser l'hydrolyse de peptide en vue de leur dégradation, et le second de lever l'inhibition d'une protéase. Prises de concert, ces informations nous permettent de nous concentrer sur la nécessaire réorganisation du cerveau, et de la dégradation de certaines molécules ou réseaux que cela implique.

Réorganiser le cerveau, mettre en place le système nerveux, et établir les connections entre les axones nécessite de nombreux acteurs. Les cônes de croissance par exemple doivent subir des régulations rapides et locales au cours de leur déplacement, et les déterminants régulant son développement sont des éléments centraux dans l'organisation du système nerveux. Dans l'étude des cônes de croissance une équipe a montré le rôle de l'ubiquitine lorsque les neurones traversent l'axe central. Les éléments régulateurs du devenir du cône de croissance sont en partie contrôlés par un mécanisme dépendant de la dégradation via l'ubiquitine (Myat et al., 2002).

Des études chez l'Aplysie ont de plus démontré que lors de la mise en place d'une habitude à long terme, la régulation de l'activité des sous-unités régulatrices de la PKA était contrôlée par la voie de dégradation de l'ubiquitine (Hegde et al., 1993). Cette dégradation permet à la PKA de rester active, et ainsi participe activement au passage de la facilitation synaptique à court terme, à des phénomènes à long terme (Hedge et al., 1997).

Les régulations post-traductionnelles par l'addition d'ubiquitine semblent avoir un rôle crucial dans la régulation à la fois des structures et des fonctions des synapses. En contrôlant leur stabilité, activité et localisation, l'ubiquitine participe ainsi à la formation des schémas neuronaux, et des connections synaptiques.

De ce fait, l'ubiquitine tend à remodeler les synapses pour l'acquisition et le stockage

de la mémoire.

Un rôle hypothétique de *dbr* dans la mise en place de la LTM pourrait être de médier la poly-ubiquitination de produits, préalablement phosphorylés par l'augmentation de la PKA dans les cellules des CPs, en vue de leur dégradation. Le passage de la MCT à la MLT est engagé, une première vague d'expression de gène est déjà passée. Une seconde se met en place, correspondant à la fin de la procédure de la mise en place de la MLT. De nouvelles synapses sont créées, d'autres sont restructurées, ou détruites. C'est lors de ces événements que *dbr* et la voie de dégradation *via* l'ubiquitine interviennent potentiellement.

ANNEXES 1

Afin de s'assurer de la rigueur expérimentale de nos résultats, notre laboratoire a pour pratique de faire vérifier les résultats comportementaux principaux par d'autres expérimentateurs. Ainsi les expériences de sur-expression des RNAi de CG5630, et de CG31191 ont été re-testées par une notre laboratoire. Mais plusieurs points importants de discordance sont apparus avec mes propres résultats. Un des problèmes récurrent des expériences de comportement est leur reproductibilité. La LTM est difficile à obtenir, car la seule expérience qui permette de la valider avec certitude est celle où nous aurions pour chaque phénotype un contrôle du même génotype avec CXM, qui le moyen le plus sûr d'inhiber la synthèse protéique. Ainsi un score hypothétique de 35 peut refléter soit une LTM qui s'est faiblement formée, soit une LTM qui ne s'est pas formée et c'est avant tout de la ARM que nous mesurons.

Ainsi les expériences de sur-expression des RNAi tout au long du développement ont été effectuées, et il est apparu que le génotype *MB/RNAi-31191* aboutit également à une chute de mémoire significative. Lorsque que j'ai effectué cette expérience (fig 50) aucune chute de mémoire ne fut observée avec les trois RNAi de CG31191. Or lorsque ces expériences ont été refaites et il apparaît que *MB/RNAi-31191* donne une chute de mémoire significative (fig. 72).

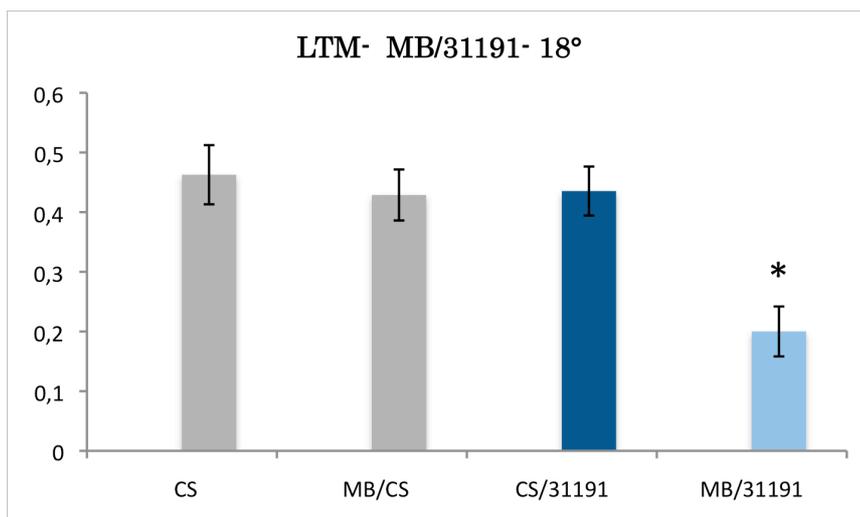


Figure 72 : contrôle des expériences de comportement concernant CG31191

Les lignées sont exposées à un conditionnement espacé, et leur mémoire testée 24h plus tard. N=9-10

Il semble bien qu'au cours de cette expérience ce soit de la LTM qui fut générée comme l'atteste les scores des différents contrôles. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces divergences, tel le fond génétique des différentes lignées. Le fond génétique de notre lignée n'est peut-être plus adapté aux nouvelles conditions d'expérimentation. En effet celles-ci évoluent au fil des problèmes rencontrés, et des découvertes.

J'ai acquis la certitude au cours de ces 5 années qu'en faisant du comportement sur la drosophile de façon quasi-quotidienne, il est très délicat d'obtenir de la LTM de manière constante. C'est une expérience extrêmement sensible. Nous sommes soumis à des variations expérimentales qui viennent à la fois des expérimentateurs (bien que chacun s'efforce d'appliquer un protocole précis), et des conditions d'expérimentations. Des écarts de température lors du développement, alors que l'élevage se fait normalement dans des étuves où la température est strictement contrôlée, des variations lors des phases de test ou de conditionnement, la position des machines à test lors de la phase de test, l'apparition de biais au cours de l'expérience, des courants d'air dans la pièce de génétique renvoyant les odeurs des étuves, ces mêmes étuves plus ou moins pleines, etc... sont autant de facteurs qui influent la qualité de nos expériences de comportement. Et les mutants sont d'autant plus sensibles à ces variations qu'ils portent une mutation fonctionnelle dans le processus étudié. La suite logique après avoir pris note de cette différence est de re-faire une troisième fois ces expériences, par un autre expérimentateur.

Enfin les expériences concernant CG5630 ont également été vérifiées. Il apparaît que bien que présentant une chute de mémoire (scores inférieurs à 0,2), les sur-expressions du RNAi de CG5630 en suivant le patron d'expression de MB247 ou de Gal4027 n'aboutissent pas à une baisse significative (figure 73). Néanmoins au cours de ces expériences, nous pouvons noter que les contrôles CS, *MB247/CS*, et *Gal4027/CS*, présentent des scores plutôt faibles de mémoire pour de la LTM. Si ceux-ci avaient leur niveau normal, à savoir au moins 0,35, la chute serait clairement significative. Mais est-ce que les scores des lignées *MB247/RNAi-5630* et *Gal 4027/RNAi-5630* auraient augmentés ou seraient ils à ce même niveau ?

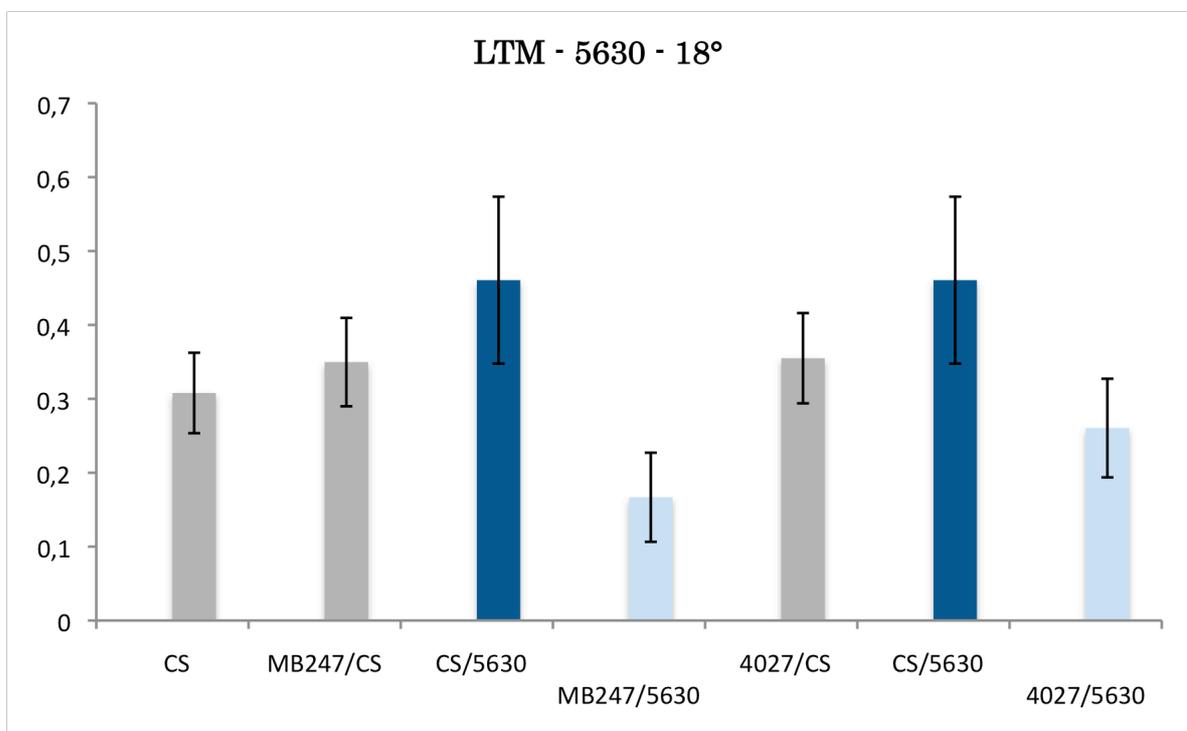


Figure 73 : contrôle des expériences de comportement concernant CG5630

Les lignées sont exposées à un conditionnement espacé, et leur mémoire testée 24h plus tard. N=6-13

Le gène *debra*

Comme pour le mutant Gal4027 où nous avons vérifié les données comportementales, le laboratoire a vérifié mes données comportementales en sur-exprimant uniquement à l'état adulte et dans les CPs le RNAi contre le gène *debra*. Les résultats sont présentés sur la figure 74.

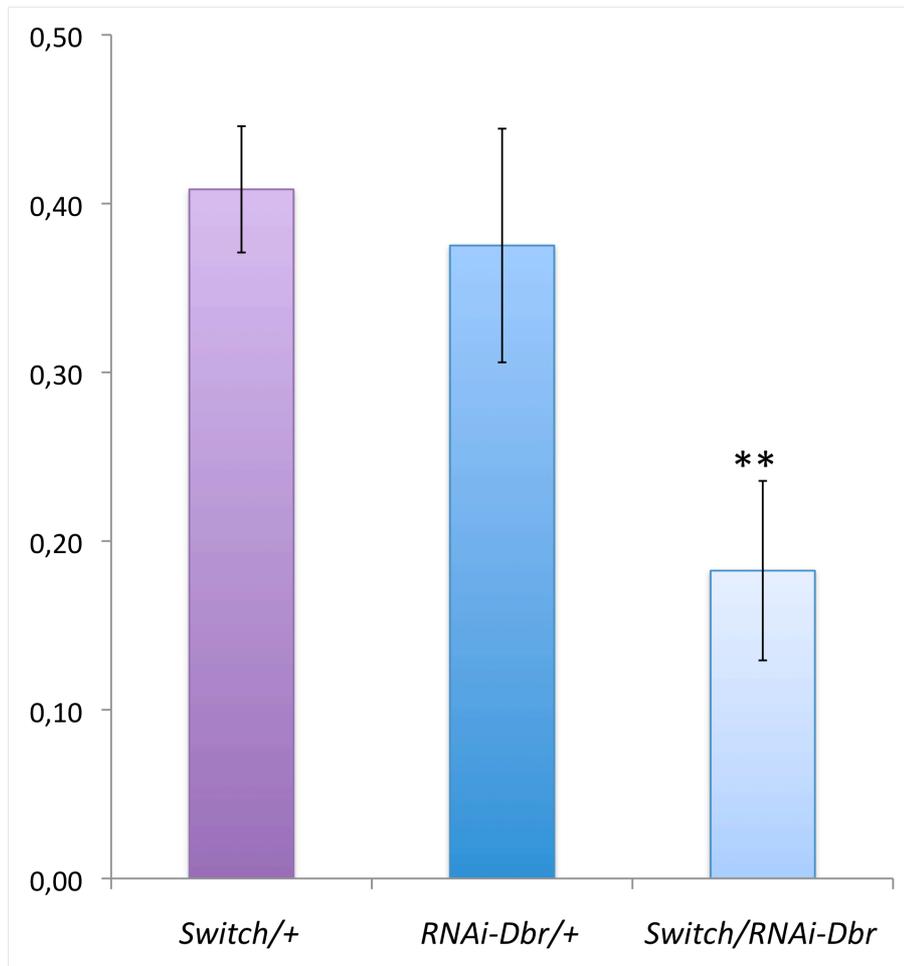


Figure 74 : contrôle des expériences de comportement concernant *Debra*

Les lignées sont exposées à un conditionnement espacé, et leur mémoire testée 24h plus tard. N=6-8

Le gène CG31191

D'après les résultats obtenus lors des expériences contrôles des gènes mutés dans Gal 4027, il apparaît que CG31191 est également potentiellement responsable du phénotype de perte de mémoire à 24h après un conditionnement espacé. Il est donc important de savoir quel peut-être le rôle et la fonction de ce gène. En suivant la même logique effectuée avec les gènes *debra* et CG5630, en se focalisant sur des prédictions basées sur les données de la littérature et sur des résultats de génomique fonctionnelle de provenances diverses, nous allons tenter de définir quelle pourrait être la fonction moléculaire et le rôle des produits de ce gène. La figure 75 qui suit présente les interactions potentielles de CG31191

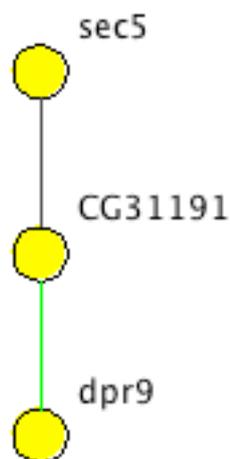


Figure 75 : Diagramme des interactions supposées de CG31191 avec *sec5*, et de *dpr9*

Seul deux gènes interagissent potentiellement avec CG31191. Il s'agit dans un premier temps du gène *sec5*. Ce gène semble être impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques et a de très nombreux partenaires comme représenté sur la figure 76

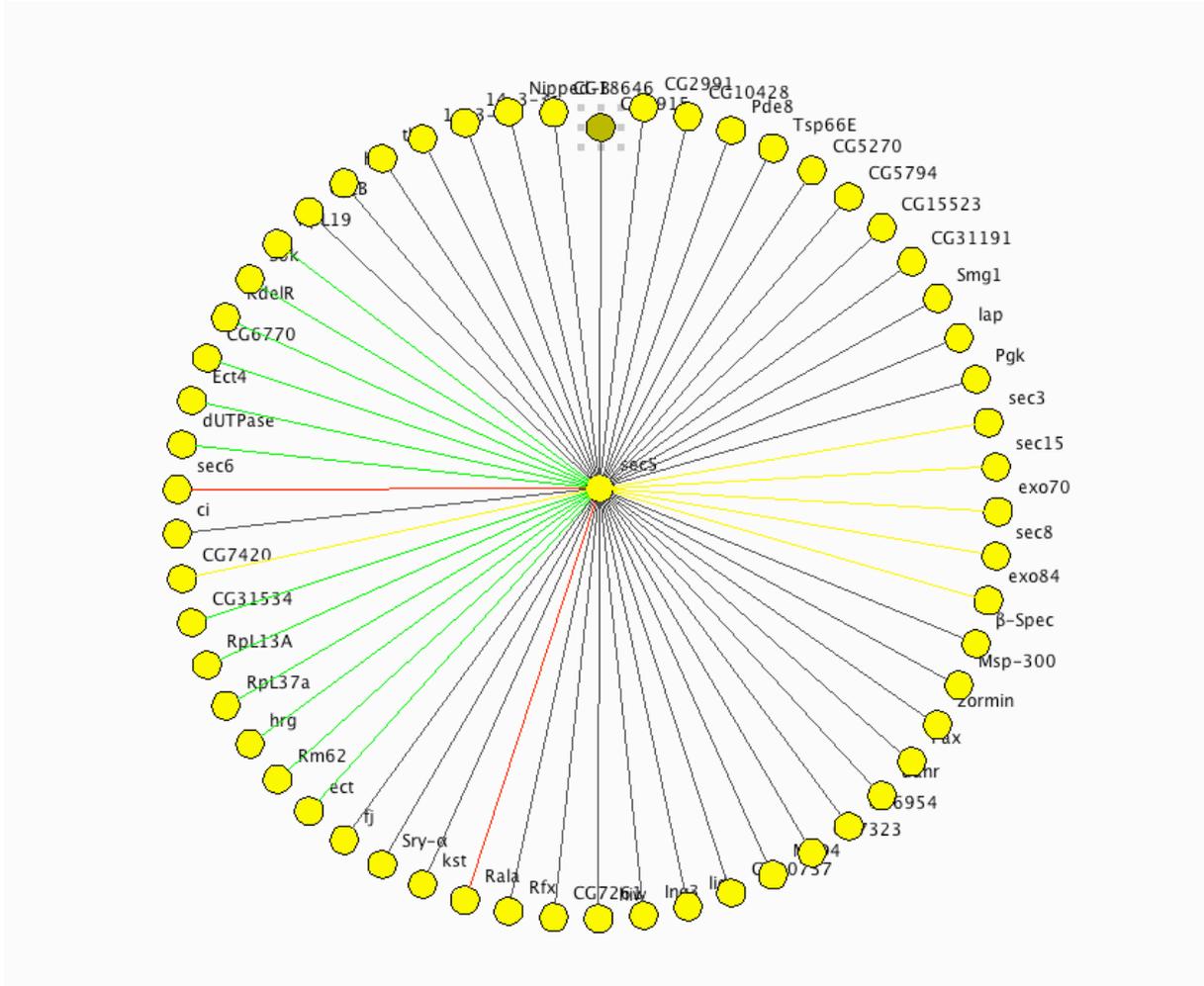


Figure 76 : Diagramme des interactions supposées de *sec5*

sec5 est une protéine qui participe à un complexe macromoléculaire, l'exocyste, défini initialement chez *S. cerevisiae*. Il s'agit d'un complexe protéique permettant l'arrimage à la membrane pré-synaptique des vésicules synaptiques (Moskalenko et al., 2002). *sec5* intervient dans des processus d'exocytose, de développement de neurones (Murthy, M. and Schwarz, T. L 2004 ; Murthy, M. et al., 2003) de sécrétion de neurotransmetteur (Lloyd et al., 2006). La formation d'un contact synaptique entre un neurone et sa cible fait intervenir *sec5*. Un rôle de *sec5* et plus généralement du complexe exocyste dans la plasticité synaptique est hypothéqué par les auteurs.

L'autre gène interagissant avec CG31191 est dpr9. Le schéma de ses interactions potentielles est représenté ci dessous figure 77.

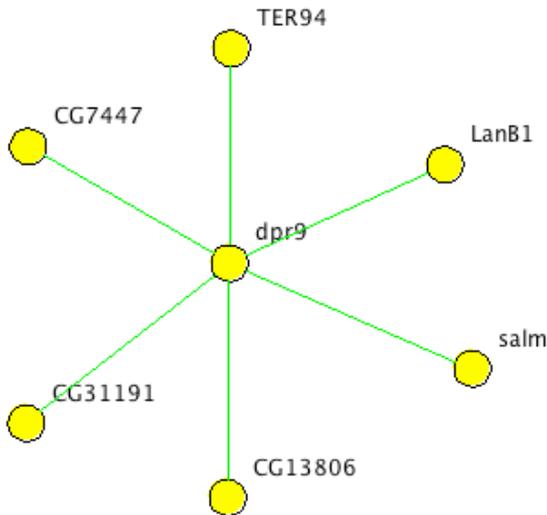


Figure 77 : diagramme des interactions de dpr9

salm est un facteur de transcription à doigt de zinc. TER94 semble être une ATPase impliqué dans des phénomènes de réorganisation du cytosquelette, et de localisation de protéine. Il semble également avoir un rôle essentiel pour la localisation de l'ARNm de *oskar* (Xiao et al., 2002 ; Ruden et al., 2000). CG13806 selon des données d'analyse de séquence être impliqué dans le métabolisme de la chitine, un des principaux composants de l'exosquelette des insectes et autres arthropodes. CG7447 quant à lui code une protéine de liaison au calcium. Il est tout de même intéressant de noter que FlyBase place un article de recherche portant sur la comparaison des génomes de drosophile et humain concernant les maladies liées au retard mental (Inlow & Restifo, 2004). On peut également noter que dpr9 interagit avec LanB1, qui lui-même interagit avec CG12432 le reliant ainsi à CG5630 (voir figure 68).

A la lumière des données de comportements obtenues par d'autres chercheurs du laboratoire concernant le gène CG31191, et des données bibliographiques, nous pouvons penser que peut-être au final CG5630 et CG31191 sont impliqués tout les deux dans la mémoire à long terme chez la drosophile. L'inhibition de l'expression de leur ARNm semble

aboutir dans les deux cas à une chute de mémoire, et tout les deux semblent avoir des partenaires potentiellement intéressants.

Références bibliographiques

(1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." *Science* 282(5396): 2012-8.

A

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., Kunes, S., 2006. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124, 191-205.

Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., Kornberg, T.B., 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets *Cubitus interruptus* protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.

B

Baines, R.A., 2004. Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *J Neurosci* 24, 6904-6911.

Bargmann, C.I., 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028-2033.

- J.M. Bellanger, S.S., S. Estrach, E. Portales-Casamar, S. Diriong, A.-O.F. Debant Trio : un facteur d'échange des GTPases Rho aux multiples facettes impliqué dans le guidage axonal *Medecine/Science*, 2002.
- Bergson "Essai sur la relation du corps à l'esprit"
- Bergson 1896 "Matière et Mémoire"
- Bier, E. (2005). "Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics." *Nat Rev Genet* 6(1): 9-23.
- Block, R.A., McConnell, J.V., 1967. Classically conditioned discrimination in the planarian, *Dugesia dorotocephala*. *Nature* 215, 1465-1466.
- Boquet, I., Hitier, R., Dumas, M., Chaminade, M., Preat, T., 2000. Central brain postembryonic development in *Drosophila*: implication of genes expressed at the interhemispheric junction. *J Neurobiol* 42, 33-48.
- Boynton, S., 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.
- Bridges, D., Moorhead, G.B., 2004. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2004, re10.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E.M., Davis, R.L., 1997. Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* 19, 391-402.
- Byers, D., Davis, R.L., Kiger, J.A., Jr., 1981. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the *dunce* mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289, 79-81.

C

- Chang, K.T., Shi, Y.J., Min, K.T., 2003. The *Drosophila* homolog of Down's syndrome critical region 1 gene regulates learning: implications for mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15794-15799.
- Chen, C.N., Denome, S., 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.
- Chen, C.H., von Kessler, D.P., Park, W., Wang, B., Ma, Y., Beachy, P.A., 1999. Nuclear trafficking of *Cubitus interruptus* in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* 98, 305-316.
- Chen, W., Ren, X.R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., de Sauvage, F., Lefkowitz, R.J., 2004. Activity-dependent internalization of smoothensin mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 306, 2257-2260.
- Cheng, Y., Endo, K., Wu, K., Rodan, A.R., Heberlein, U., Davis, R.L., 2001. *Drosophila fasciclinII* is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell* 105, 757-768.
- Chiang, A.S., Blum, A., Barditch, J., Chen, Y.H., Chiu, S.L., Regulski, M., Armstrong, J.D., Tully, T., Dubnau, J., 2004. *radish* encodes a phospholipase-A2 and defines a neural circuit involved in anesthesia-resistant memory. *Curr Biol* 14, 263-272.
- Chien, S., Reiter, L.T., Bier, E., Gribskov, M., 2002. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 30, 149-151.
- Comas, D., Petit, F., Preat, T., 2004. *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430, 460-463.
- Crittenden, J.R., Skoulakis, E.M., Han, K.A., Kalderon, D., Davis, R.L., 1998. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5, 38-51.

D

- Dai, P., Akimaru, H., Ishii, S., 2003. A hedgehog-responsive region in the *Drosophila* wing disc is defined by debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Dev Cell* 4, 917-928.
- Davis, R.L., 2004. Olfactory learning. *Neuron* 44, 31-48.
- Dauwalder, B., Davis, R.L., 1995. Conditional rescue of the *dunce* learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes. *J Neurosci* 15, 3490-3499.
- Debant, A., Serra-Pages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S.H., Streuli, M., 1996. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5466-5471.
- de Belle, J.S., Heisenberg, M., 1994. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263, 692-695.
- de Belle, J.S., Heisenberg, M., 1996. Expression of *Drosophila* mushroom body mutations in alternative genetic backgrounds: a case study of the mushroom body miniature gene (*mbm*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9875-9880.
- Desai, C.J., Garrity, P.A., Keshishian, H., Zipursky, S.L., Zinn, K., 1999. The *Drosophila* SH2-SH3 adapter protein Dock is expressed in embryonic axons and facilitates synapse formation by the RP3 motoneuron. *Development* 126, 1527-1535.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., Dickson, B.J., 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156.
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., Tully, T., 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476-480.
- Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., Broger, C., Tully, T., 2003. The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13, 286-296.
- DeZazzo, J., Sandstrom, D., de Belle, S., Velinzon, K., Smith, P., Grady, L., DelVecchio, M., Ramaswami, M., Tully, T., 2000. *nalyot*, a mutation of the *Drosophila* myb-related Adf1 transcription factor, disrupts synapse formation and olfactory memory. *Neuron* 27, 145-158.
- DeZazzo, J., Xia, S., Christensen, J., Velinzon, K., Tully, T., 1999. Developmental expression of an *amn(+)* transgene rescues the mutant memory defect of *amnesiac* adults. *J Neurosci* 19, 8740-8746.
- Didelot, G., Molinari, F., Tchénio, P., Comas, D., Milhiet, E., Munnich, A., Colleaux, L., Preat, T., 2006. *Tequila*, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313, 851-853.
- Drain, P., Folkers, E., 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., Yin, J.C., 2002. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 5, 316-324.
- Dudai, Y., 1988. Neurogenetic dissection of learning and short-term memory in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* 11, 537-563.
- Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., 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., Tully, T., 1993. Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 9, 1-14.

F

- Feany, M.B., Quinn, W.G., 1995. A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Science* 268, 869-873.
- Ferreira, A., Rapoport, M., 2002. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci* 59, 589-595.
- Folkers, E., Drain, P., Quinn, W.G., 1993. Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8123-8127.
- Folkers, E., Waddell, S., Quinn, W.G., 2006. The *Drosophila* radish gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17496-17500.
- Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J.A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M.P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., Daviet, L., 2005. Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* 15, 376-384.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Frodin, M., Gammeltoft, S., 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151, 65-77.

G

- Gao, Q., Yuan, B., Chess, A., 2000. Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3, 780-785.
- Gasque, G., Labarca, P., Reynaud, E., Darszon, A., 2005. Shal and shaker differential contribution to the K⁺ currents in the *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurosci* 25, 2348-2358.
- Ge, X., Hannan, F., Xie, Z., Feng, C., Tully, T., Zhou, H., Xie, Z., Zhong, Y., 2004. Notch signaling in *Drosophila* long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10172-10176.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J., Rothberg, J.M., 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736.
- Godenschwege, T.A., Reisch, D., Diegelmann, S., Eberle, K., Funk, N., Heisenberg, M., Hoppe, V., Hoppe, J., Klagges, B.R., Martin, J.R., Nikitina, E.A., Putz, G., Reifegerste, R., Reisch, N., Rister, J., Schaupp, M., Scholz, H., Schwarzel, M., Werner, U., Zars, T.D., Buchner, S., Buchner, E., 2004. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur J Neurosci* 20, 611-622.
- Goldstein, L.S., Gunawardena, S., 2000. Flying through the *drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol* 150, F63-68.
- Grima, B., Lamouroux, A., Chélot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B., Rouyer, F., 2002. The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature* 420, 178-182.

- Grotewiel, M.S., Beck, C.D., Wu, K.H., Zhu, X.R., Davis, R.L., 1998. Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature* 391, 455-460.
- Guo, H.F., The, I., Hannan, F., Bernards, A., Zhong, Y., 1997. Requirement of *Drosophila* NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science* 276, 795-798.
- Guo, H.F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L., Zhong, Y., 2000. A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature* 403, 895-898.

H

- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J., 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2, 110-119.
- Hartley, D., 1749. *Observation on Man, his frame, his duty and his expectation*.
- Hebb D.O., *The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory*, Wiley, New York, 1949
- Hegde, A.N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D.G., Martin, K.C., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 89, 115-126.
- Hegde, A.N., Goldberg, A.L., Schwartz, J.H., 1993. Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7436-7440.
- Hering E. "Über das Gedächtniss als eine allgemeine Function der organisirten Materie." *Almanach der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften* "Wien, 1870, 20, 253-278. Traduction anglaise : *Memory as a universal function of organised matter*.
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L., Zipursky, S.L., 1999. Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 97, 853-863.
- H. Hydén and E. Edyházi, "Nuclear RNA changes of nerve cells during a learning experiment in rats." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48 (1962), pp. 1366–1373.

I

- Impey, S., Obrietan, K., Storm, D.R., 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23, 11-14.
- Inlow, J.K., Restifo, L.L., 2004. Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 166, 835-881.
- Isabel, G., Pascual, A., Preat, T., 2004. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024-1027.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., 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., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D., 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.

J

- Jefferis, G.S., Marin, E.C., Stocker, R.F., Luo, L., 2001. Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414, 204-208.
- Jiang, J., Struhl, G., 1998. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.

K

- Kandel, E., Abel, T., 1995. Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. *Science* 268, 825-826.
- Keene, A.C., Waddell, S., 2007. *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 8, 341-354.
- Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Tonegawa, S., 2004. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44, 59-73.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., Tear, G., 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.
- Kidd, T., Russell, C., Goodman, C.S., Tear, G., 1998. Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20, 25-33.
- Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1996. *frazzled* encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87, 197-204.
- Krashes, M.J., Keene, A.C., Leung, B., Armstrong, J.D., Waddell, S., 2007. Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron* 53, 103-115.

L

- Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F., Stocker, R.F., 1999. Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 405, 543-552.
- Lee, T., Lee, A., Luo, L., 1999. Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126, 4065-4076.
- Lee, Y.S., Carthew, R.W., 2003. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30, 322-329.
- Levin, L.R., Han, P.L., Hwang, P.M., Feinstein, P.G., Davis, R.L., Reed, R.R., 1992. The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68, 479-489.
- Lloyd, T.E., Verstreken, P., Ostrin, E.J., Phillippi, A., Lichtarge, O., Bellen, H.J. (2000). A genome-wide search for synaptic vesicle cycle proteins in *Drosophila*. *Neuron* 26(1): 45--50.
- Livingstone, M.S., Sziber, P.P., Quinn, W.G., 1984. Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylyl cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37, 205-215.
- Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R.K., von Kessler, D.P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., Beachy, P.A., 2003. Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol Cell* 12, 1261-1274.
- Lum, L., Beachy, P.A., 2004. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* 304, 1755-1759.

M

- Mansuy, I.M., 2003. Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1195-1208.
- Mao, Z., Roman, G., Zong, L., Davis, R.L., 2003. Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 198-203.
- Marshall, E., 2002. Genome sequencing. Public group completes draft of the mouse. *Science* 296, 1005.
- Marin, E.C., Jefferis, G.S., Komiyama, T., Zhu, H., Luo, L., 2002. Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109, 243-255.
- Martin, J.R., Raabe, T., Heisenberg, M., 1999. Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* 185, 277-288.
- Martin, K.C., Kandel, E.R., 1996. Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17, 567-570.
- Maupertuis, *Système de la Nature*, 1754
- McConnell, J.V., 1962. Memory transfer through cannibalism in planarium. *J. Neuropsychiat.* 3 suppl 1 542-548
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., Davis, R.L., 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.
- McGuire, S.E., Mao, Z., Davis, R.L., 2004. Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE* 2004, pl6.
- McGuire, S.E., Le, P.T., Davis, R.L., 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293, 1330-1333.
- Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S., St Johnston, D., 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J* 19, 1366-1377.
- Mirenowicz, J., Schultz, W., 1996. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379, 449-451.
- Molinari, F., Rio, M., Meskenaitė, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., Sonderegger, P., Colleaux, L., 2002. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298, 1779-1781.
- Moreau-Fauvarque, C., Taillebourg, E., Boissoneau, E., Mesnard, J., Dura, J.M., 1998. The receptor tyrosine kinase gene *linotte* is required for neuronal pathway selection in the *Drosophila* mushroom bodies. *Mech Dev* 78, 47-61.
- Moskalenko S, H.D., Rosse C, Mirey G, Camonis JH, White MA. , 2002. The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4: 66-72.
- Murthy, M., Garza, D., Scheller, R.H., Schwarz, T.L., 2003. Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron* 37, 433-447.
- Murthy, M., Schwarz, T.L., 2004. The exocyst component Sec5 is required for membrane traffic and polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* 131, 377-388.
- Muzzopappa, M., Wappner, P., 2005. Multiple roles of the F-box protein Slimb in *Drosophila* egg chamber development. *Development* 132, 2561-2571.
- Myat, A., Henry, P., McCabe, V., Flintoft, L., Rotin, D., Tear, G., 2002. *Drosophila* Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron* 35, 447-459.

N

- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Newsome, T.P., Asling, B., Dickson, B.J., 2000. Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* 127, 851-860.
- Ng, M., Roorda, R.D., Lima, S.Q., Zemelman, B.V., Morcillo, P., Miesenbock, G., 2002. Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron* 36, 463-474.
- Ng, M., Roorda, R.D., Lima, S.Q., Zemelman, B.V., Morcillo, P., Miesenbock, G., 2002. Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron* 36, 463-474.
- Nighorn, A., Healy, M.J., 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.

O

- Ogden, S.K., Ascano, M., Jr., Stegman, M.A., Robbins, D.J., 2004. Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol* 67, 805-814.

P

- Pascual, A., Preat, T., 2001. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294, 1115-1117.
- Perazzona, B., Isabel, G., Preat, T., 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., 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.
- Philip, N., Acevedo, S.F., 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.
- Pinto, S., Quintana, D.G., Smith, P., Mihalek, R.M., Hou, Z.H., Boynton, S., Jones, C.J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J.A., Austin, R.J., Lane, W.S., Tully, T., Dutta, A., 1999. *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. *Neuron* 23, 45-54.
- Potter, C.J., Huang, H., Xu, T., 2001. *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 105, 357-368.
- Préat, 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., Andres, A.J., 2004. Notch is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1764-1768.
- Price, M.A., Kalderon, D., 2002. Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* 108, 823-835.

Q

- Quinn, W.G., Harris, W.A., Benzer, S., 1974. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 708-712.
- Quinn, W.G., Sziber, P.P., Booker, R., 1979. The *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Nature* 277, 212-214.

R

- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E., 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11, 1114-1125.
- Riemensperger, T., Voller, T., Stock, P., Buchner, E., Fiala, A., 2005. Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* 15, 1953-1960.
- Rohrbough, J., Grotewiel, M.S., Davis, R.L., Broadie, K., 2000. Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity. *J Neurosci* 20, 6868-6878.
- Rohrbough, J., Pinto, S., Mihalek, R.M., Tully, T., Broadie, K., 1999. *latheo*, a *Drosophila* gene involved in learning, regulates functional synaptic plasticity. *Neuron* 23, 55-70.
- 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., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaître, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., Voshall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Lewis, S., 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204-2215.
- Ruden, D.M., Sollars, V., Wang, X., Mori, D., Alterman, M., Lu, X. (2000). Membrane fusion proteins are required for oskar mRNA localization in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Biol.* 218(2): 314--325.

S

- Sacktor, T.C., Osten, P., Valsamis, H., Jiang, X., Naik, M.U., Sublette, E., 1993. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8342-8346.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sciandra, R.J., Jr., Bennett, J., 1976. Behavior and single gene substitution in *Drosophila melanogaster*. I. Mating and courtship differences with *w*, *cn*, and *bw* loci. *Behav Genet* 6, 205-218.
- Schacter, D. L. (2001). *Forgotten ideas, neglected pioneers: Richard Semon and the story of memory*. Philadelphia: Psychology Press.
- Schacter, D. L., Eich, J. E., and Tulving, E. (1978). Richard Semon's theory of memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* 17, 721-743.
- Schuster, C.M., Davis, G.W., Fetter, R.D., Goodman, C.S., 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17, 641-654.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M., 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23, 10495-10502.
- Scott, K., Brady, R., Jr., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., Axel, R., 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104, 661-673.
- Sengupta, P., Colbert, H.A., Kimmel, B.E., Dwyer, N., Bargmann, C.I., 1993. The cellular and genetic basis of olfactory responses in *Caenorhabditis elegans*. *Ciba Found Symp* 179, 235-244; discussion 244-250.

- Shulman, J. M., L. M. Shulman, (2003). "From fruit fly to bedside: translating lessons from *Drosophila* models of neurodegenerative disease." *Curr Opin Neurol* 16(4): 443-9.
- Simon, A.F., Boquet, I., Synguelakis, M., Preat, T., 1998. The *Drosophila* putative kinase *linotte* (derailed) prevents central brain axons from converging on a newly described interhemispheric ring. *Mech Dev* 76, 45-55.
- Shimada, T., Kato, K., Kamikouchi, A. and Ito, K., 2005. Analysis of the distribution of the brain cells of the fruit fly by an automatic cell counting algorithm. *Physica A* 350: , 144-149.
- Skoulakis, E. M. and R. L. Davis (1996). "Olfactory learning deficits in mutants for *leonardo*, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein." *Neuron* 17(5): 931-44.
- Skoulakis, E.M., Kalderon, D., 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.
- Spradling, A.C., Stern, D.M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T., Rubin, G.M., 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10824-10830.
- Spieth, H.T., 1974. Courtship behavior in *Drosophila*. *Annu Rev Entomol* 19, 385-405.
- Squire L.S., K. E. R. (1999). "Memory, from mind to molecules." *Scientific American Library*.

T

- Taylor, S.S., Buechler, J.A., Yonemoto, W., 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59, 971-1005.
- Thompson, R. and McConnell C. J. (1955). "Classical conditioning in the planarian, *Dugesia dorotocephala*." *J Comp Physiol Psychol* 48(1): 65-8.
- Tully, T., Quinn, W.G., 1985. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* 157, 263-277.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., Del Vecchio, M., 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.

V

- van den Heuvel, M., 2003. Hedgehog signalling: off the shelf modulation. *Curr Biol* 13, R686-688.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert,

- D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vosshall, L.B., Wong, A.M., Axel, R., 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147-159.

W

- Waddell, S., Armstrong, J.D., Kitamoto, T., Kaiser, K., 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.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., Sanger, H.L., 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1984; 314: 1-340.)
- Wolf, R., Wittig, T., Liu, L., Wustmann, G., Eyding, D., Heisenberg, M., 1998. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learn Mem* 5, 166-178.
- Wolf, R., Heisenberg, M., 1990. Visual control of straight flight in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* 167, 269-283.
- Wong, A.M., Wang, J.W., 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., Tully, T., 2007. Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nat Neurosci* 10, 1578-1586.

X

- Xia, S., Miyashita, T., Fu, T.F., Lin, W.Y., Wu, C.L., Pyzocha, L., Lin, I.R., Saitoe, M., Tully, T., Chiang, A.S., 2005. NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Curr Biol* 15, 603-615.

Xiao, L., Fu, C., Lao, P., Ruden, D.M. (2002). Posh, Rac2, Bluestreak, and Ter94 are required for proper rhabdomere development in *Drosophila*. *A. Dros. Res. Conf.* 43 : 238A.

Xu, G.F., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R., Tamanoi, F., 1990. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements *ira* mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 63, 835-841.

Y

Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H., Tully, T., 1995. 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., 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., Quinn, W.G., 1995. 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.

Yoshihara, M., Suzuki, K., Kidokoro, Y., 2000. Two independent pathways mediated by cAMP and protein kinase A enhance spontaneous transmitter release at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* 20, 8315-8322.

Yu, D., Ponomarev, A., 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.

Z

Zars, T., Wolf, R., Davis, R., Heisenberg, M., 2000. Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the rutabaga mutant memory defect: in search of the engram. *Learn Mem* 7, 18-31.

Zhang, L., Duan, C.J., Binkley, C., Li, G., Uhler, M.D., Logsdon, C.D., Simeone, D.M., 2004. A transforming growth factor beta-induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. *Mol Cell Biol* 24, 2169-2180.

Zhang, W., Zhao, Y., Tong, C., Wang, G., Wang, B., Jia, J., Jiang, J., 2005. Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of *Cubitus interruptus*. *Dev Cell* 8, 267-278.

Zhou, Y., Reddy, S., Murrey, H., Fei, H., Levitan, I.B., 2003. Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel. *J Biol Chem* 278, 10073-10080.

Zhou, Y., Schopperle, W.M., Murrey, H., Jaramillo, A., Dagan, D., Griffith, L.C., Levitan, I.B., 1999. A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* 22, 809-818.

Zhou, Y., Wang, J., Wen, H., Kucherovsky, O., Levitan, I.B., 2002. Modulation of *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel activity by bound protein kinase a catalytic subunit. *J Neurosci* 22, 3855-3863.