



HAL
open science

Réponses comportementales et préférences envers les acides gras à longue chaîne chez *Drosophila* *melanogaster*

Anne-Sophie Fougeron

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Fougeron. Réponses comportementales et préférences envers les acides gras à longue chaîne chez *Drosophila melanogaster*. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS076 . tel-00704984

HAL Id: tel-00704984

<https://theses.hal.science/tel-00704984v1>

Submitted on 6 Jun 2012

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
En Sciences Biologiques

Par
Anne-Sophie FOUGERON

Soutenue le 2 décembre 2011

**Réponses comportementales et préférences envers les
acides gras à longue chaîne chez *Drosophila melanogaster***

JURY :

Marie-Laure PARMENTIER Chargé de Recherche INSERM, Université de Montpellier
Rapporteur

Alain ROBICHON Directeur de Recherche CNRS, Université Nice Sophia Antipolis
Rapporteur

Frédéric MARION-POLL Professeur, INRA Université de Versailles
Examineur

Michel NARCE Professeur, Université de Bourgogne
Examineur

Jean-François FERVEUR Directeur de Recherche, CNRS Université de Bourgogne
Directeur de thèse

Jean-Pierre FARINE Chargé de Recherche, CNRS Université de Bourgogne
Co-encadrant

À Damien et ma famille

Remerciements

Je tiens à remercier Mr Jean-François Ferveur, directeur du laboratoire, pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de son équipe, pour son encadrement et ses conseils dans un domaine qui était alors tout nouveau pour moi. J'ai eu la chance d'avoir été encadré par un chercheur reconnu dans son domaine, et à raison.

Je remercie également Jean-Pierre Farine, mon co-directeur. J'ai eu beaucoup de plaisir à apprendre avec toi, ta rigueur de chimiste et toutes tes connaissances sur les insectes m'impressionnent. Tu as été un véritable mentor, dit « the boss », tu as su me mettre sur les rails et me conseiller comme il faut. Merci !

Je tiens également à remercier mes rapporteurs et examinateurs, Marie-Laure Parmentier, Alain Robichon, Frédéric Marion-Poll et Michel Narce qui ont accepté de juger mon travail. Merci de m'avoir accordé de votre temps et pour m'avoir conseillée.

Un grand, que dis-je, un ENORME merci à Claude pour ses conseils en statistiques. Sans toi, je ne sais pas ce que j'aurai fait ! Merci pour ta patience et ton temps, essayer de m'inculquer quelques notions de statistiques n'était pas une mince affaire ! Je suis encore loin de ton niveau, mais j'apprends et je fais des efforts ! tu as maintenant droit à tes petits fours...

Je tiens à remercier Justin, pour ses discussions scientifiques constructives, et son aide. Et puis aussi pour son amitié ! J'ai bien rigolé grâce à toi. Tu as aussi tenté de m'apprendre les biostats...tu m'as bien aidé. Merci.

Attention, maintenant je ne serais plus derrière toi, donc sers-toi de ton agenda !

Thank you Anna ! a new friend who is so unique. I really appreciate our conversations, I learned many things about Germany and football! You are a good friend now.

Merci à José, Jérôme et Serge...je dis merci à la place de mes mouches ! mais également pour les bons moments passés ensemble à table. J'ai bien rigolé grâce à vous les repas n'étaient pas mornes !

Merci aussi à Yaël pour ses conseils, toujours prêt à rendre service, à Debhia et Martine, même si on n'a pas mangé beaucoup ensemble, j'ai apprécié nos discussions. Maintenant que je ne serai plus au labo mouches, il faudra trouver l'éthanol sans moi ! Alex, merci pour nos conversations et certaines lignées gentiment donnée pour les besoins de la science.

Je veux remercier tous les membres du labo pour leur accueil et leurs conseils. Jean-Phi, dès que j'aurai appris à jouer au go, on fera une partie.

Un énorme merci à Damien d'être là pour moi, à ma famille adorée qui me soutient pour tout, en particulier mes parents et mon petit frère...je tiens à souligner le « petit », je serais toujours ta grande sœur ! mes grands-parents, mes cousins et mes oncles et tantes, qui sont tous formidables (merci Marie-France pour les petits mail quotidiens).

Enfin, merci à toutes ces mouches utilisées à des fins scientifiques ; sans elles rien ne seraient possible. En plus, elles ne se sont jamais plaintes de quoi que se soit...elles ont été formidables !

Sommaire

Introduction	p18
1.1 Le système chimiosensoriel chez les mammifères.....	p18
1.1.1 L'olfaction.....	p18
1.1.2 La gustation.....	p19
1.2 Le système chimiosensoriel chez la drosophile.....	p21
1.2.1 L'olfaction.....	p21
1.2.1.1 L'olfaction chez les larves	p21
1.2.1.2 L'olfaction chez les adultes	p22
1.2.2 La gustation	p26
1.2.2.1 La gustation chez les larves.....	p26
1.2.2.2 La gustation chez les adultes.....	p27
1.3 Les acides gras.....	p29
1.3.1 L'apport en AGs dans la nourriture.....	p29
1.3.2 La perception des AGs chez les mammifères.....	p30
1.3.3 La perception des AGs chez les insectes.....	p32
1.3.4 La synthèse des AGs chez les animaux	p33
1.3.5 La relation entre les AGs et le métabolisme.....	p36
Matériels et méthodes	p40
2.1 Les AGs utilisés	p40
2.2 Les différents milieux d'élevage.....	p41
2.3 Les différentes lignées de drosophiles utilisées.....	p42
2.4 Les individus testés.....	p43
2.4.1 Les tests comportementaux sur les larves	p43
2.4.1.1 Récolte des larves de drosophiles.....	p43
2.4.1.2 Tests d'attraction.....	p44
2.4.1.3 Suivi individuel des larves (trajectométrie).....	p45
2.4.1.4 Test de répulsion.....	p46
2.4.1.5 Mesure de l'activité locomotrice des larves.....	p47
2.4.1.6 Sélection.....	p47
2.4.2 Tests comportementaux sur les adultes	p47

2.4.2.1 L'olfactomètre en Y	p47
2.4.2.2 PER (Proboscis Extension Reflex).....	p49

Résultats **p51**

3.1 Etude de larves témoins élevées sur un milieu témoin.....	p51
3.1.1 Larves sauvages (Di2 et CS).....	p51
3.1.1.1 Tests d'attraction	p51
3.1.1.2 Suivi individuel des larves témoins.....	p53
3.1.1.3 Tests de répulsion.....	p57
3.1.1.4 Indice de groupe.....	p60
3.2 Etude des larves de lignées mutantes.....	p62
3.2.1 Les larves mutantes desat1.....	p62
3.2.1.1 Tests d'attraction avec 6 AGs.....	p62
3.2.1.2 Tests de répulsion avec 6 AGs	p64
3.2.2 Les larves des lignées RA, RC, RE, RD et RDio possédant la séquence Gal4/UAS RNAi desat1.....	p68
3.2.2.1 Tests d'attraction avec 3 AGs.....	p68
3.2.2.2 Tests de répulsion avec 3 AGs.....	p70
3.2.3 Les larves Elav*33 338.....	p74
3.2.3.1 Tests d'attraction avec 3 AGs.....	p74
3.2.3.2 Tests de répulsion avec 3 AGs.....	p76
3.2.4 Les larves CheB42a.....	p77
3.2.4.1 Tests d'attraction avec 4 AGs.....	p77
3.2.4.2 Tests de répulsion avec 4 AGs.....	p78
3.3 Etude de larves témoins élevées sur un milieu carencé en AGs (purée de pomme de terre).....	p80
3.3.1 Tests d'attraction avec 2 AGs.....	p80
3.3.2 Comportement individuel des larves carencées.....	p82
3.4 Sélection expérimentale.....	p87
3.5 Etude avec les adultes.....	p90
3.5.1 Labyrinthe en Y.....	p90
3.5.2 Tests de gustation (PER).....	p92
3.5.2.1 PER chez les lignées sauvages Di2 et CS.....	p92
3.5.2.2 PER chez la lignée mutante CheB42a.....	p94

Discussion	p97
1. Perception sensorielle des AGs par les drosophiles.....	p97
2. Bases neurogénétiques des comportements de réponse.....	p100
3. Métabolisme et perception.....	p105
4. Changement de préférence au cours du développement.....	p107
Annexes	p111
Bibliographie	p114
Résumé	p126
Abstract	p127

Stagiaires

Certaines expériences ont été effectuées avec l'aide de stagiaires que j'ai encadrés, je tiens à les remercier, leur aide m'a été précieuse.

Les tests de répulsion sur les larves sauvages ont été effectués par Jing TIAN, stagiaire de M2 Recherche en Sciences des Aliments, Sensorialité et Comportement.

Les tests sur les larves provenant d'un milieu purée ont été réalisés avec l'aide d'Emeline CADOUX, stagiaire de M1 Physiologie de nutrition, alimentation et santé.

Les tests de groupe sur les *desat1*, et les lignées RE-Gal4 et RC-Gal4 ont été effectués par Joan DUPREZ, stagiaire de M1 Sciences de la terre, de l'univers et de l'environnement.

Enfin, les tests de groupe sur les lignées RE-Gal4/RNAi *desat1* et RC-Gal4/RNAi *desat1*, ont été effectuées avec l'aide d'Anaïs CHAPART, stagiaire de BTS biotechnologies.

Liste des figures

Figure I1. Tableau des récepteurs gustatifs des mammifères et leurs ligands. (D'après (Yarmolinsky, Zuker and Ryba 2009). (p20)

Figure I2: A–E: microscopie électronique à haute résolution de sensilles de drosophiles. (D'après Shanbhag, Muller and Steinbrecht, 1999). (p23)

Figure I3 : Schéma récapitulatif du métabolisme des $\omega 3$ et $\omega 6$ en éicosanoïdes. (p34)

Figure I4 : Schéma représentant la biosynthèse des hydrocarbures cuticulaires chez la drosophile. (p37)

Tableau M1 : Tableau récapitulatif des AGs utilisés. (p40)

Tableau M2: Quantité d'AGs ($\mu\text{g/g}$ milieu) dans les différents milieux d'élevage. (p41)

Figure M3 : Schéma de la région promotrice du gène *desat1* de *Drosophila melanogaster*. (D'après Bousquet et al. en révision) (p43)

Figure M4 : Schéma du test d'attraction. (p44)

Figure M5 : Schéma du test de répulsion. (p46)

Photographie M6 : Photographie du dispositif de l'olfactomètre en Y. (p48)

Figure R1: Résultats du test de préférence pour les larves Di2 et CS en fonction des différents AGs testés. (p53)

Figure R2 : Représentation du chemin parcouru par les larves Di2, en présence de différents AGs (C18:0 ou C18:1 à conc 10) ou d'éthanol, en fonction du temps. (p54)

Figure R3 : Représentation de l'activité locomotrice relative des larves Di2 en fonction des AGs testés. (p55)

Figure R4 : Représentation graphique du premier et second choix fait par les larves confrontées à un AG vs éthanol ou confrontées à 2 AGs. (p56)

Figure R5 : Temps relatif passé sur les zones d'intérêt par les larves. (p57)

Figure R6 : Représentation de l'indice de répulsion en fonction de la lignée et des AGs testés. (p58)

Figure R7 : Représentation du nombre de larves sortant de la zone de test en fonction du temps (min). (p60)

Figure R8 : Indice de groupe sur les Di2 avec les différents AGs testés (conc 10). (p61)

Figure R9 : Temps de sortie des larves (en sec). (p62)

Figure R10: Représentation graphique des tests de discrimination effectués avec les larves desat1-N2 (restaurée pour desat1) et 1573 (mutante), en fonction des différents AGs dosés à différentes concentrations. (p64)

Figure R11 : Indice de répulsion des lignées N2 et 1573 en fonction des différents AGs testés. (p65)

Figure R12 : Indice de groupe (IG) des larves Di2 et desat1, en fonction des AGs (conc 10). (p66)

Figure R13 : Durée maximale des contacts pour des lignées Di2 et 1573 en fonction des AGs (conc 10). (p67)

Figure R14 : Représentation graphique de l'activité locomotrice des larves Di2 et 1573. (p68)

Figure R15: Tests d'attraction réalisés avec les différents génotypes RA/33, RC/33, RD/33, RDio/33 et RE/33 et leurs témoins respectifs, en fonctions des différents AGs testés (conc 10). (p70)

Figure R16 : Indice de répulsion des différentes lignées et leur témoin respectif, en fonction des différents AGs utilisés (conc 10). (p72)

Figure R17: Indice de groupe des larves RC et RC/33 et des larves RE et RE/33 selon les différents AGs (conc 10). (p73)

Figure R18 : Durée maximale des contacts établis entre les larves RC et RC/33 et les larves RE et RE/33 selon les différents AGs (conc 10). (p74)

Photo 1 : Photographie de cerveau de larve possédant les 2 transgènes Elav-Gal4 et UAS-GFP. (p75)

Figure R19 : Tests d'attraction réalisés avec les larves Elav et Elav/33, en fonction des différents AGs (conc 10). (p76)

Figure R20 : Indice de répulsion des lignées Elav et Elav/33, en fonction des différents AGs testés (conc 10). (p77)

Figure R21 : Tests d'attraction effectués avec les larves CheB42a, en fonction des différents AGs. (p78)

Figure R22 : Indice de répulsion des larves CheB42a, en fonction des différents AGs testés (conc 10). (p79)

Figure R23 : Tests d'attraction réalisés avec les larves témoins et carencées, en fonction des différents AGs (conc 10). (p81)

Figure R24: Premier et second choix (%) des larves dans l'arène de test. (p83)

Figure R25: Temps relatif (en sec) passé par les larves dans les cercles d'intérêt. (p84)

Figure R26: Activité locomotrice relative (mm) des larves. (p85)

Figure R27: Exemple de chromatogramme obtenu après extraction des acides gras libres d'une larve de troisième stade de *D. melanogaster* (lignée Di2). (p86)

Tableau TR1 : Quantités d'AGs libres (ng) détectées chez les larves. (p86)

Figures R28 à R32 : Test de sélection avec Di2, sur le C18:0 (conc 10). (p88 à 90)

Figure R33 : Réponses des mâles et des femelles adultes envers le C18:0 dans l'olfactomètre en Y. (p91)

Figure R34 : Réponses des mâles et des femelles adultes envers le C18:3 dans l'olfactomètre en Y. (p92)

Figure R35 : Résultats du test PER avec les Di2 et les CS, en fonction des différents AGs testés (conc 10). (p94)

Figure R36 : Résultats du test PER avec la lignée mutante CheB42a, en fonction des différents AGs testés (conc 10). (p95)

Liste des annexes

Annexe A1 : Indice de groupe des Di2 en fonction de la durée des contacts (sec), selon les différents AGs testés (conc 10). (p111)

Annexe A2 : Indice de groupe des larves 1573 en fonction du temps (sec), selon les différents AGs testés (conc 10). (p112)

Annexe A3 : Expression de Desat1 pilotée par différents promoteurs alternatifs dans la larve de *Drosophila melanogaster*. (D'après Bousquet et al. en révision) (p113)

Abréviations :

5,9-HD : 5,9-heptacosadiène
7,11-HD : 7,11-heptacosadiène
7-P : 7 pentacosène
7-T : 7-tricosène
AA : Acide Arachidonique
AE : Apports Energétiques
AGs : Acides Gras
ARN : Acide Ribonucléique
ARNi : Acide Ribonucléique interférent
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfert
CD36 : Cluster of Differentiation 36
CS: Canton S
cVA : *cis*-vacceanyl acétate
DCSO : Organe Sensoriel Cibarial Dorsal
DGLA : Acide Dihomo- γ Linoléinique
DHA : Acide Docosahexanoïque
DO : Organe Dorsal
DOG : Ganglion de l'Organe Dorsal
DPS : Organe Dorso-Pharyngeal
DRK : Delayed Rectifying Potassium channels
dSREBP : drosophila Sterol Regulatory Element Binding Protein
EPA : Acide Eicosapentanoïque
EtOH: éthanol
Fabp : Fatty Acid Binding Protein
FAS : Fatty Acid Synthase
GABA : Acide γ Aminobutyrique
GFP : Green Fluorescent Protein
GLA : Acide γ Linoléinique
GLP-1 : Glucagon-Like Peptide 1
GPCR : Récepteur Couplé à la Protéine G
GPR : G Protein-coupled Receptor
GR : Gustatory Receptor
GRN : Gustatory Receptor Neuron
H : hydrocarbures saturés
LAL : Lobe Antennaire Larvaire
LH: Lateral Horn
LSO : Organe Sensoriel Labral
MB : Mushroom Body
OBP : Odorant Binding Protein
OR : Olfactory Receptor
Orco : Olfactory Receptor CO-receptor
ORN : Olfactory Receptor Neuron
PCR: Polymerase Chain Reaction
PER: Proboscis Extension Reflex
PN : Neurone de Projection
PPS : Organe Pharyngeal Postérieur

SNMP : Sensory Neuron Membran Protein
SOG : Sub-Oesophageal Ganglion
TO : Organe Terminal
TRPM5 : Transient Receptor Potential Channel Type M5
UAS : Upstream Activating Sequence
VCSO : Organe Sensoriel Cibarial Ventral
VO : Organe Ventral
VPS : Organe Ventro-Pharyngeal

Introduction

Les animaux vivent dans un environnement rempli de molécules volatiles et non-volatiles, leur permettant, par exemple, de communiquer entre eux ou de se nourrir en évitant les substances toxiques pour l'organisme. Il existe deux systèmes chimiosensoriels adaptés à ces fonctions : le système olfactif et le système gustatif. Le premier sert à détecter les molécules volatiles présentes dans l'environnement, alors que le second permet de détecter les molécules non-volatiles.

Peu d'études ont été menées sur la perception de molécules importantes comme les acides gras (AGs) qui sont essentielles pour les êtres vivants. Les AGs sont connus pour faire partie de voies métaboliques importantes comme la synthèse d'hormones et de phéromones; ce sont des éléments constitutifs des phospholipides et des glycolipides qui eux-mêmes sont des constituants des membranes lipidiques; ils représentent également un réservoir énergétique important. Certains de ces AGs, que l'organisme vivant est incapable de synthétiser, sont même dit « indispensables » et doivent donc être consommés.

Malgré les liens établis entre AGs et certaines maladies (cancers, obésité), peu d'études ont été menées sur la perception ces composés. De récentes études ont montré que les insectes et les mammifères possédaient un système olfactif comparable (Hildebrand and Shepherd 1997, Strausfeld and Hildebrand 1999). En revanche, en ce qui concerne le système gustatif, les insectes et les mammifères possèdent des organisations différentes. En effet, les mammifères n'ont qu'un organe destiné à la gustation, alors que les insectes en possèdent plusieurs distribués sur toute la surface du corps.

1.1 Le système chimiosensoriel chez les mammifères

1.1.1 L'olfaction

L'olfaction chez les mammifères s'effectue grâce à l'épithélium olfactif situé dans la cavité nasale. On peut séparer l'olfaction en deux voies : la voie orthonasale (les molécules

atteignent l'épithélium olfactif via le nez) et la voie rétronasale (les molécules atteignent l'épithélium via la cavité buccale lors de la mastication).

Les molécules odorantes étant des molécules de petite taille de nature hydrophobes, elles sont prises en charge par des OBPs (Odorant Binding Protein) dans le mucus nasal. Les OBPs, qui y sont sécrétées, lient de façon réversible les molécules odorantes afin de les transporter jusqu'aux récepteurs olfactifs. Les récepteurs olfactifs sont des GPCRs (Récepteur Couplé à la Protéine G) (Buck and Axel 1991) possédant 7 domaines transmembranaires dont l'expression est réduite à l'épithélium olfactif. Il existe environ un millier de gènes différents codant les récepteurs olfactifs chez les souris et les rats. Une molécule odorante est reconnue par de nombreux récepteurs et un récepteur reconnaît de nombreux odorants. Chaque neurone exprime un seul récepteur olfactif (Malnic et al. 1999). Il existe donc un code combinatoire qui permet aux mammifères de détecter des milliers de molécules odorantes.

Il existe une représentation des odeurs dans le cerveau, une sorte de carte olfactive. En effet, tous les neurones exprimant le même récepteur projettent leurs axones dans une seule zone du glomérule olfactif. Il existe donc une carte d'activation neuronale de chaque molécule odorante dans le bulbe olfactif. Le cerveau sera alors capable de déterminer quelle molécule odorante, véhiculée par l'air, le mammifère respire.

Les mammifères possèdent également un autre sens leur permettant de détecter des molécules mais non-volatiles cette fois. Il s'agit de la gustation.

1.1.2 La gustation

Les mammifères possèdent également un autre sens leur permettant de détecter des molécules non-volatiles. Il s'agit de la gustation qui s'effectue grâce à la langue et au palais.

Les molécules non volatiles et sapides des aliments vont être détectées grâce aux cellules gustatives. Celles-ci sont contenues dans des bourgeons du goût (formées par 50 à 100 cellules) (Delay, Kinnamon and Roper 1986, Kinnamon, Henzler and Royer 1993, Lindemann 2001) contenus dans les papilles de la langue. On trouve également des bourgeons du goût sur le palais.

Les cellules gustatives se trouvent à l'intérieur du bourgeon du goût et possèdent des récepteurs gustatifs à leur extrémité apicale (pore gustatif). Les molécules sapides vont se lier

à leur récepteur et provoquer une dépolarisation de la membrane et la libération d'un neurotransmetteur. Ce dernier va alors activer un neurone sensoriel qui va transmettre l'information au cerveau via les nerfs.

Un tableau récapitulatif de ces différents récepteurs permettant la reconnaissance des goûts est représenté sur la figure I1.

Il existe 5 goûts décrits dans la littérature : le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami.

Les goûts sucré et umami sont reconnus par des hétérodimères contenant le récepteur T1R, Les hétérodimères formés de T1R2-T1R3 vont reconnaître les sucres et les hétérodimères formés de T1R1-T1R3 vont reconnaître l'umami (Nelson et al. 2001, Nelson et al. 2002, Li et al. 2002, Zhao et al. 2003). Les récepteurs T1Rs sont des protéines couplées à une protéine G. Le goût amer est détecté par les récepteurs T2Rs (Chandrashekar et al. 2000, Meyerhof et al. 2005) qui sont des protéines G. Le salé, quant à lui, est reconnu via des canaux sodiques et l'acide par le canal potassique PKD2L1 (Heck, Mierson and Desimone 1984, Huang et al. 2006). Enfin, le CO₂ est détecté par l'anhydrase carbonique 4, une enzyme ancrée au glycosylphosphatidylinositol (Chandrashekar et al. 2009).

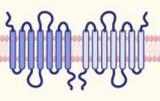
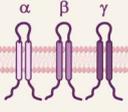
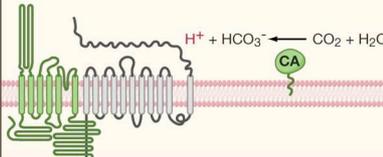
Mammalian taste receptors and cells				
Umami	Sweet	Bitter	Sodium	Sour and carbonation cells
				
T1R1+T1R3 L-glutamate L-amino acids glycine L-AP4 Nucleotide enhancers IMP, GMP, AMP	T1R2+T1R3 Sugars Sucrose, fructose, glucose Artificial sweeteners saccharin, acesulfame K aspartame, cyclamate D-amino acids D-alanine, D-serine, D-phenylalanine Glycine Sweet proteins Monellin, thaumatin	~30 T2Rs Cycloheximide (mT2R5) Denatonium (mT2R8, hT2R4) Salicin (hT2R16) PTC (hT2R38) Saccharin (hT2R43, hT2R44) Quinine strychnine atropine	ENaC Low NaCl Sodium salts	PKD2L1 Acids Citric acid Tartaric acid HCl CA IV Carbonated drinks

Figure I1. Tableau des récepteurs gustatifs des mammifères et leurs ligands (d'après Yarmolinsky et al. 2009).

1.2 Le système chimiosensoriel chez la drosophile

1.2.1 L'olfaction

Chez la drosophile, quelques molécules comme le sucre, le sel, les substances amères et les acides aminés ont fait l'objet d'études permettant de mieux comprendre leur perception et les différentes voies métaboliques impliquées (van Naters and Carlson 2006, Vosshall and Stocker 2007).

1.2.1.1 L'olfaction chez les larves

Les larves de drosophile possèdent sur leur partie antérieure, 3 organes sensoriels externes : l'organe dorsal (DO), l'organe terminal (TO) et l'organe ventral (VO). Ces organes comportent des sensilles sensorielles permettant à la larve de percevoir les molécules présentes dans son environnement.

Seul le DO est impliqué dans la perception olfactive. C'est un organe constitué d'un dôme, contenant 1 sensille avec plusieurs pores, et de 6 sensilles périphériques. Le dôme est innervé par 32 neurones dont 21 ORNs (Olfactory Receptor Neuron) (Oppliger, Guerin and Vlimant 2000, Kreher, Kwon and Carlson 2005, Heimbeck et al. 1999). Lorsque l'on inhibe ces 21 neurones, les larves deviennent anosmiques, ce qui suggère que ce sont les seuls neurones olfactifs chez les larves (Larsson et al. 2004a, Fishilevich et al. 2005).

Lorsqu'une molécule odorante atteint le DO, elle va alors se fixer sur des ORs, présents sur les dendrites des ORNs. Vingt-cinq ORs (Olfactory Receptor) différents sont exprimés chez les larves. Parmi ces ORs, 14 sont spécifiques au stade larvaire et 11 existent à la fois chez les larves et chez les adultes (Fishilevich et al. 2005). Les ORs larvaires répondent à des composés aromatiques et aliphatiques présents dans la nourriture (Kreher et al. 2005). Chaque ORN co-exprime à la fois un OR récepteur du ligand, et un récepteur OR83b qui vont former un hétérodimère fonctionnel (Larsson et al. 2004a, Benton et al. 2006). L'expression du gène Or83b semblait restreinte au 2/3 des ORNs (Larsson et al. 2004a) mais une étude récente a montré qu'Or83b était requis pour le trafic et le bon fonctionnement des ORs des cellules basiconiques et trichoïdes chez les adultes et pour tous les ORs larvaires (Benton et al. 2006). Il existe cependant une exception, une classe d'ORN qui ne requière pas Or83b

pour un fonctionnement correct : l'ORN exprimant Gr21a et Gr63a, qui répond au CO₂ (Suh et al. 2004, Benton et al. 2006, Faucher et al. 2006).

Une odeur est détectée par de multiples ORNs et un ORN peut répondre à plusieurs odeurs (Kreher et al. 2005) Il a été démontré qu'il existe chez les larves de drosophiles un code combinatoire. En effet, Fishilevich *et al* (2005) ont montré que les larves ne possédant qu'une paire d'ORNs fonctionnels étaient capables de répondre à un stimulus chimiosensoriel. Si les larves ne possèdent qu'un seul de ces ORNs, alors elles ne répondent plus à ce stimulus (Fishilevich et al. 2005).

Les corps des neurones olfactifs du dôme sont regroupés dans un ganglion appelé DOG (Dorsal Organ Ganglion). Ils projettent leurs axones dans une structure appelée lobe antennaire larvaire (LAL). Ils projettent leurs neurones dans des glomérules individuels de ce LAL et sont interconnectés entre eux par des interneurones locaux. Enfin les neurones de projection (PNs) relaient l'information provenant du LAL aux calyces des corps pédonculés (ou mushroom bodies (MB) calyx), et aux cornes latérales (ou lateral horn (LH)), 2 centres olfactifs plus profonds situés dans le système nerveux central de la larve (Marin et al. 2005, Python and Stocker 2002).

Le LAL possède 21 glomérules (Fishilevich et al. 2005, Kreher et al. 2005, Ramaekers et al. 2005). Chaque ORN exprime son propre OR et va se projeter dans un seul glomérule. Il a été montré que chaque glomérule était ensuite innervé par un ou plusieurs PNs (Ramaekers et al. 2005). Ces PNs vont relayer l'information à un ou deux glomérules du MB. En comparant les sites d'entrées et de sorties de plusieurs types de PNs, Masuda-Nakagawa *et al* ont montré que chaque glomérule du LAL était relié spécifiquement à un glomérule du MB (Masuda-Nakagawa, Tanaka and O'Kane 2005). Python et Stocker (2002) ont démontré que les ORNs et les neurones de projection sont cholinergiques alors que les interneurones locaux sont GABAergiques (Python and Stocker 2002). On peut donc décrire une carte précise du chemin neuronal qui va être stimulé lorsqu'une molécule odorante va activer un OR (Masuda-Nakagawa et al. 2009).

1.2.1.2 L'olfaction chez les adultes

Bien que plus complexe, le système olfactif des adultes est relativement similaire à celui des larves et implique un plus grand nombre de cellules.

Les adultes possèdent des organes olfactifs localisés sur la tête, comme les vertébrés, représentés par les palpes maxillaires et le troisième segment antennaire. Ils abritent les ORNs qui sont contenus dans des sensilles olfactives dont le rôle est de les protéger. Chaque sensille peut abriter de 1 à 4 ORNs, supportés par des cellules spécialisées, appelés cellules de maintien. Elles vont sécréter la lymphe sensillaire et garder chaque sensille isolée de sa voisine.

Il existe 3 types de sensilles olfactives classées selon leur taille, leur morphologie, et le type de molécule odorante détectée (Shanbhag, Muller and Steinbrecht 1999): les sensilles basiconiques (grandes et petites), les sensilles coeloconiques et les sensilles trichoïdes (figure I2).

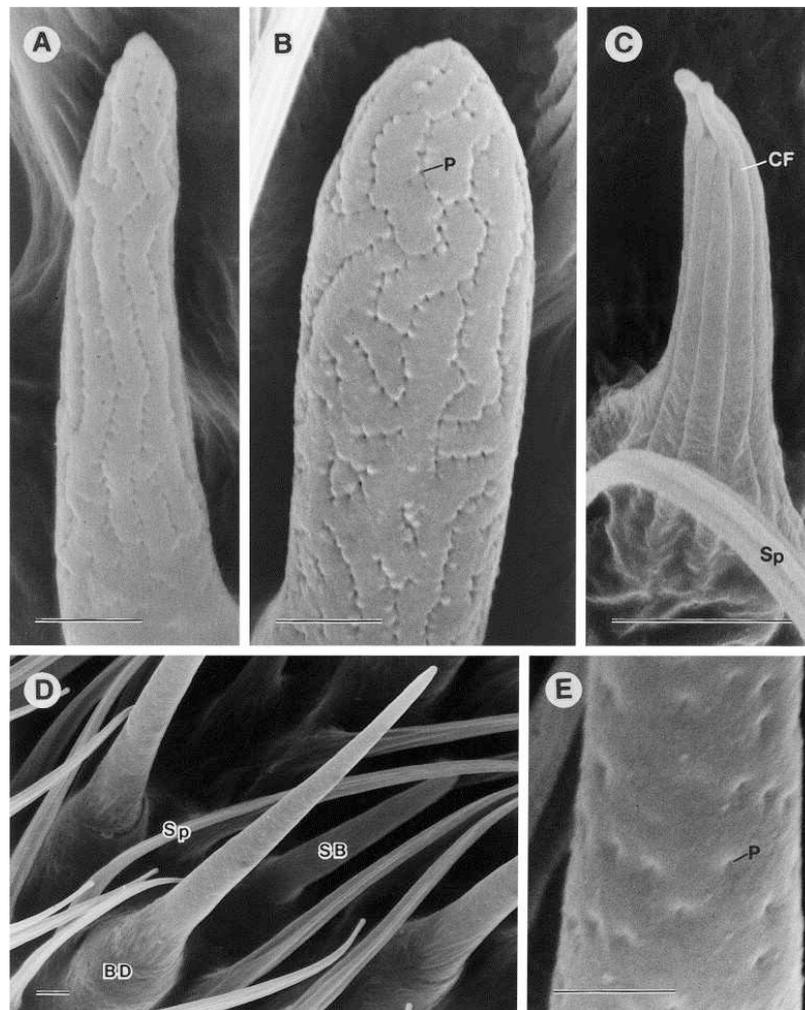


Figure I2: A–E: microscopie électronique à haute résolution de sensilles de drosophiles.

A et B: petite (A) et grande (B) sensilles basiconiques, C: sensille coeloconique, D et E: sensille trichoïdes. Barre d'échelle en A, B, D 1 μ m, en C et E 0.5 μ m (photographies de C. Bock, Seewiesen). D'après Shanbhag, Muller and Steinbrecht, 1999.

Les antennes possèdent ces 3 types de structures, et totalisent environ 1300 ORNs. En revanche, les palpes maxillaires ne possèdent que des sensilles basiconiques abritant chacune 2 ORNs. Les molécules odorantes vont entrer dans la sensille par les pores de la cuticule et vont être prise en charge dans la lymphé sensillaire par des molécules insolubles appelées OBPs. Ces OBPs, au nombre de 51 (Hekmat-Scafe et al. 2002), vont permettre à la molécule odorante d'interagir avec l'OR correspondant. Il existe chez la drosophile de 1 à 4 ORs exprimés par un ORN, ce qui confère une réponse spécifique du neurone aux odeurs (Clyne et al. 1999, Gao and Chess 1999, Vosshall et al. 1999, Robertson, Warr and Carlson 2003). À ce jour, on a pu déterminer l'existence de 62 ORs exprimés à partir de 60 gènes, 2 ORs étant produits par l'épissage alternatif d'ARN. Comme chez les vertébrés, les ORs sont des protéines possédant 7 domaines transmembranaires. En revanche, ces protéines possèdent une topologie inversée par rapport aux ORs des vertébrés ou des nématodes (Buck and Axel 1991, Troemel et al. 1995, Benton et al. 2006, Wistrand, Kall and Sonnhammer 2006).

Comme chez les larves, les ORNs des adultes expriment le récepteur Or83b. Il est important de noter que le gène codant Or83b est le gène le plus conservé parmi les insectes; à la différence des autres ORs, il est exprimé dans la plupart des ORNs. Les orthologues d'Or83b ont été trouvés chez d'autres espèces de mouches et chez quelques moustiques (Jones et al. 2005, Melo et al. 2004, Krieger et al. 2003, Pitts, Fox and Zwiebel 2004). En utilisant le système UAS-Gal4 pour exprimer les orthologues d'Or83b chez des drosophiles mutantes pour le gène Or83b, Jones *et al.* (2005) ont démontré que l'expression de la protéine orthologue permettait de restaurer le phénotype sauvage. Récemment, Vosshall et Hansson (2011) ont même proposé un nom commun, Orco (Olfactory Receptor CO-receptor), pour toutes les espèces d'insectes qui possèdent ce type de récepteur (Vosshall and Hansson 2011). La fonction de ce récepteur particulier a été analysée (Larsson et al. 2004a, Neuhaus et al. 2005). Sa mutation a pour conséquence d'inhiber la réponse aux odeurs de 3 ORNs sur 4 dans une sensille appartenant aux antennes. Les différentes interactions entre Or83b et les autres ORs ont été étudiées grâce à la technique BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert). Cela a permis de mettre en évidence une interaction directe entre Or83b et d'autres ORs. Neuhaus *et al.* (2005) ont également réussi à co-exprimer Or83b et Or43a ou Or22a dans des cellules embryonnaires de rein humains (HEK293) (Neuhaus et al. 2005).

La co-expression d'Or83b avec un autre OR permet d'augmenter le nombre de cellules transfectées répondant à un stimulus odorant mais n'altère en rien la spécificité de la réponse. Il semblerait qu'Or83b soit impliqué dans le transport de l'OR avec lequel il est co-exprimé, ainsi que le bon fonctionnement de cet OR (Benton et al. 2006). Sato *et al.* (2008) ont démontré que les ORs des insectes agissaient en tant qu'hétérodimères formés par un OR et un canal ionique (Sato et al. 2008).

Il existe une classe d'ORN qui ne requiert pas OR83b pour un bon fonctionnement. Comme chez les larves, il s'agit des ORNs exprimant Gr21a et Gr63a, qui sont sensibles au CO₂. Des études électrophysiologiques et comportementales ont démontré que les mutants pour Gr63a ne répondaient plus au CO₂ (Suh et al. 2004, Benton et al. 2006, Faucher et al. 2006).

Une fois le récepteur activé par la liaison de son ligand, l'ORN va subir une dépolarisation qui va générer ainsi un potentiel d'action. Ce signal va être transmis à un centre primaire composé de plusieurs glomérules, le lobe antennaire. Dans la plupart des cas, les ORNs exprimant le(s) même(s) récepteur(s) vont converger vers le(s) même(s) glomérule(s) du lobe antennaire (Gao, Yuan and Chess 2000, Vosshall, Wong and Axel 2000). Lorsqu'une sensille olfactive est composée de plusieurs ORNs, on n'observe pas de lien entre ces ORNs, Mais des ORNs exprimant des ORs similaires vont projeter leurs axones dans des glomérules proches, ce qui confère ainsi un regroupement central malgré une dispersion périphérique des ORs (Couto, Alenius and Dickson 2005, Fishilevich and Vosshall 2005). Couto *et al* ont décrit une « identité glomérulaire » pour chaque ORNs basiconiques et trichoïdes des antennes et pour chaque ORNs basiconiques des palpes maxillaires (Couto et al. 2005). Grâce à cette étude, ils ont également montré qu'il y avait une représentation glomérulaire des odeurs et que les composés aliphatiques et aromatiques vont activer des glomérules bien distincts. On a donc une carte glomérulaire des molécules odorantes dans le lobe antennaire.

Deux types de neurones co-existent dans le lobe antennaire des drosophiles : les neurones de projections et les neurones locaux, ou interneurones. Les neurones de projection sont les neurones qui vont transmettre l'information vers des centres plus profonds comme le MB et le LH. Ces neurones sont des neurones cholinergiques, comme la plupart des neurones excitateurs découverts chez les insectes (Stocker 1994). Quelques neurones de projection sont toutefois GABAergiques (Wilson and Laurent 2005, Okada, Awasaki and Ito 2009) et permettent d'inhiber le signal. Les neurones locaux sont des neurones particuliers qui, contrairement aux neurones de projection, ne forment pas de connections à l'extérieur du lobe antennaire. Ils vont permettre à chaque glomérule d'être connecté entre eux. Ils peuvent être

excitateurs ou inhibiteurs selon qu'ils relarguent du GABA ou de l'acétylcholine (Shang et al. 2007).

Les neurones de projections vont relayer l'information vers des centres plus profonds, les centres secondaires, constitués du MB et le LH (Lin et al. 2007). Les MBs sont impliqués dans l'apprentissage, dont l'apprentissage olfactif (Heisenberg et al. 1985). Le LH semble être impliqué dans la reconnaissance olfactive, mais qui ne serait pas liée à un apprentissage (Debelle and Heisenberg 1994). Les neurones de projection projettent leurs synapses vers les cellules de Kenyon du MB se trouvant dans le calice où se trouvent environ 2500 cellules de Kenyon (Technau and Heisenberg 1982, Ito et al. 1997). Ces neurones vont, à leur tour transférer le signal à différentes régions du cerveau (Ito et al. 1998). Ces auteurs suggèrent que le MB ne serait qu'un relais intermédiaire pour l'apprentissage et non un centre d'apprentissage en lui-même.

Certains neurones de projection projettent leurs axones vers le LH. Les axones des neurones d'un même glomérule du lobe antennaire projettent leurs axones vers les mêmes zones du LH. Ainsi, la carte topographique résultant de l'information olfactive du lobe antennaire est maintenue dans les centres plus profonds du traitement de l'information olfactive (Marin et al. 2002, Wong, Wang and Axel 2002).

1.2.2 La gustation

1.2.2.1 La gustation chez les larves

Comme chez les mammifères, les insectes sont également confrontés dans leur environnement à des molécules non-volatiles qu'elles doivent détecter grâce à l'appareil gustatif.

Les larves de drosophiles possèdent 3 organes leur permettant de « goûter » les molécules non-volatiles de leur environnement. Elles sont ainsi capables d'apprécier la qualité de la nourriture grâce au DO (Organe Dorsal), qui est un organe également impliqué dans la perception olfactive, le TO (Organe Terminal) et le VO (Organe Ventral).

Le DO est composé de 6 sensilles périphériques impliquées dans la gustation. Cet organe abrite 32 neurones dont 9 gustatifs, 2 mécanosensoriels et 21 olfactifs. Le TO comprend 11 sensilles distales et 3 dorso-latérales et totalise 33 neurones dont 25 gustatifs et 8 mécanosensoriels. Le VO quant à lui, comprend 5 sensilles et 8 neurones dont 4 gustatifs et 4 mécanosensoriels.

Les larves possèdent également 3 organes sensoriels internes : l'organe dorso-pharyngeal, (DPS), l'organe ventro-pharyngeal (VPS) et enfin l'organe pharyngeal postérieur (PPS). Ces organes internes possèdent également des sensilles comprenant de 1 à 9 neurones sensoriels. Les fonctions gustatives et mécanosensorielles de ces neurones sont suggérées par la présence de pores et de soies (Python and Stocker 2002, Gendre et al. 2004).

Les sensilles gustatives des larves possèdent des neurones qui expriment différents GRs (Gustatory Receptor) (Scott et al. 2001). En utilisant la méthode UAS-Gal4, Colomb *et al* ont réussi à identifier 4 régions du SOG (Sub-Oesophageal Ganglion) dans lesquelles ces neurones se projettent. En plus d'une organisation spatiale décrite par les projections des neurones selon l'organe qui les émet, il pourrait y avoir une organisation fonctionnelle. En effet, les stimuli aversifs seraient transmis dans la partie antérieure, alors que les stimuli attractifs seraient transmis dans la partie postérieure du SOG (Colomb et al. 2007).

Peu d'études se sont intéressées aux projections neuronales entre le SOG et les centres secondaires plus profonds. Il a été démontré que 20 neurones du SOG exprimant le gène *hugin*, possédaient leurs dendrites dans le SOG. Ces dendrites se superposent avec les terminaisons des GRNs (Gustatory Receptor Neuron). Puis les axones se projettent dans le protocerebrum. En étudiant des mutants pour ces neurones, ils ont démontré que ceux-ci étaient impliqués dans la régulation de la prise alimentaire aussi bien chez les larves que chez les adultes (Melcher and Pankratz 2005).

Le système gustatif larvaire serait donc organisé de la même façon que celui des adultes, il serait juste moins complexe car le nombre de cellules mises en jeu est moindre.

1.2.2.2 La gustation chez les adultes

Le système gustatif des drosophiles adultes est organisé différemment de celui des mammifères. En effet, les drosophiles possèdent de multiples organes impliqués dans la gustation. Ceci peut-être expliqué par le fait que les insectes vivent sur leur nourriture. De plus les femelles possèdent des sensilles gustatives sur l'ovipositeur. Cette adaptation pourrait s'expliquer par le choix d'un lieu de ponte adapté (Stocker 1994). Les autres organes impliqués sont répartis sur toute la surface du corps de l'insecte. Il s'agit du proboscis (l'équivalent de la langue des mammifères), des pattes et de la bordure extérieure des ailes.

En ce qui concerne le proboscis, on peut distinguer 2 parties. En effet, il possède des sensilles sur la partie externe (sur le labellum), qui permettent aux drosophiles d'évaluer la qualité de la nourriture avant ingestion ; puis des sensilles gustatives internes, situées dans la cavité buccale qui comprend 3 organes sensoriels internes : l'organe sensoriel labral (LSO), et les organes sensoriels cibariaux ventraux et dorsaux (VCSO, DCSO). Ces organes permettraient à la mouche d'évaluer la qualité de la nourriture après ingestion, mais avant que celle-ci ne soit ingérée par le système digestif.

Le LSO comprend 9 sensilles, dont 3 gustatives, et 10 GRNs (Gendre et al. 2004). Le VCSO quant à lui, comprend 3 sensilles pour 8 GRNs et enfin le DCSO possède 2 sensilles comprenant 3 GRNs chacune.

Chaque labellum comprend environ 62 sensilles gustatives. Les sensilles gustatives des organes externes sont classées selon leur taille, leur distribution et le nombre de GRN abrités. On distingue 3 types de sensilles : les courtes (S), les longues (L) et les intermédiaires (I). Les S et les L possèdent 4 GRNs alors que les I n'en possèdent que 2.

Des études physiologiques ont révélé que les sensilles S et L contiennent chacune un GRN sensible au sucre (les cellules S), un GRN sensible à l'eau (les cellules W), un GRN activé par les faibles concentrations en sel (les cellules L1) et un GRN activé par les fortes concentrations salines (les cellules L2) (Rodrigues and Siddiqi 1981). Les sensilles I possèdent un GRN sensible à la fois au sucre et aux faibles concentrations salines, et un GRN sensible aux fortes concentrations en sel (Hiroi et al. 2004).

Il existe, chez les adultes, d'autres sensilles réparties sur d'autres parties du corps de la mouche. Les pattes T1 des mâles sont recouvertes d'environ 50 sensilles gustatives alors que les pattes T1 de la femelle n'en possèdent qu'environ 37 (Nayak and Singh 1983). Ce dimorphisme sexuel est causé par la présence de sensilles spécialisées chez le mâle, dont la fonction est de détecter les phéromones émises par les femelles (Bray and Amrein 2003). Les autres paires de pattes possèdent également des sensilles gustatives, au nombre de 30 pour les T2 et 32 pour les T3. Aucun dimorphisme sexuel n'est à noter pour ces parties du corps. Chaque sensille y abrite 2 à 4 GRNs. La bordure des ailes possède 40 sensilles gustatives qui comprennent toutes 4 GRNs. Enfin, l'ovipositeur des femelles possède environ 10 sensilles qui ont une morphologie chimiosensorielle. Cependant peu d'études se sont intéressées à ses sensilles (Stocker 1994).

Les récepteurs gustatifs (GRs) ont été identifiés grâce à des méthodes de bioinformatique puis par des méthodes d'hybridation *in situ* ou en utilisant le système UAS-Gal4 (Clyne, Warr and Carlson 2000, Dunipace et al. 2001, Scott et al. 2001). Ce sont des

protéines à 7 domaines transmembranaires. Une récente étude vient de démontrer que le GR sensible au glucose était un GPCR et plus précisément couplé à une protéine $G\alpha$ (Bredendiek et al. 2011). Grâce à des approches transgéniques et pharmacologiques, Bredendiek *et al* ont démontré que certains sucres comme le glucose et le fructose, activaient ce GPCR. Cependant, cette protéine n'est pas activée par le tréhalose, ce qui laisse supposer qu'il existe d'autres voies métaboliques permettant l'obtention d'une cascade métabolique conduisant à un potentiel d'action (Bredendiek et al. 2011).

Certains ligands de ces récepteurs ont été trouvés. Par exemple, le ligand du récepteur Gr5a est le tréhalose. Des études électrophysiologiques et comportementales ont démontré que les mutants de délétion pour ce Gr avaient une réponse diminuée vis-à-vis de ce sucre, comparée aux témoins (Dahanukar et al. 2001, Ueno et al. 2001).

L'inactivation des neurones exprimant le Gr66a diminue la réponse comportementale des drosophiles à certains composés amers, démontrant ainsi l'implication de ce récepteur dans la perception de ces molécules (Wang et al. 2004, Thorne et al. 2004).

Une fois le ligand fixé à son récepteur, un potentiel d'action est créé et ce signal du GRN va être transmis au SOG qui, contrairement au lobe antennaire, ne possède pas une organisation en glomérules. Grâce au système UAS-Gal 4 couplé à la GFP, des équipes ont pu créer une carte des zones du SOG activées par les GRNs afférents (Thorne et al. 2004, Wang et al. 2004). Les GRNs des organes internes vont se projeter dans une zone antéro-dorsale du SOG alors que les GRNs du proboscis et des pattes vont se projeter dans la partie centrale et postérieure du SOG. Certains neurones afférents provenant d'organes distincts et exprimant le même récepteur, projettent leurs axones dans la même zone, ce qui laisse penser qu'il existe également une carte des goûts dans le SOG (Marella et al. 2006).

On trouve également 2 types d'interneurones dans le SOG qui répondent soit au sucrose et à l'eau, soit au NaCl chez une autre mouche, *Sarcophaga bullata* (Mitchell and Itagaki 1992). D'autres interneurones relient le SOG au MB (Nayak and Singh 1985) relayant ainsi l'information au centre plus profond du cerveau.

1.3. Les acides gras

1.3.1 L'apport en AGs dans la nourriture

Les animaux ont tous besoin d'AGs dits indispensables puisqu'ils ne les synthétisent pas; or, ces AGs sont des constituants indispensables au bon fonctionnement des organismes.

Les AGs sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe. Ils peuvent être saturés (pas de double liaison dans la chaîne carbonée) ou insaturés (une ou plusieurs double liaisons). Ils sont les constituants majeurs des huiles et graisses. Les AGs saturés les plus largement distribués sont ceux possédant 12, 16 et 18 carbones, alors que pour les AGs insaturés, les plus importants sont ceux en C18 possédant 1, 2 ou 3 doubles liaisons. Parmi les AGs saturés, l'acide palmitique est le plus rencontré. Il est présent dans la plupart des graisses animales et végétales (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2001).

Parmi les AGs insaturés, le mono-insaturé le plus fréquent est l'acide oléique. Bien sur, l'huile d'olive d'où vient son nom, en contient en grande quantité, de 65 à 85%. Alors que le poly-insaturé le plus fréquemment trouvé est l'acide α linoléique.

Les AGs font donc partie intégrante de la nourriture des animaux. Consommés en excès, ils peuvent provoquer l'obésité, et sont des facteurs de risque de maladies telles que diabète, maladies cardio-vasculaires, certains cancers... (Haslam and James 2005). Ainsi, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a émis des recommandations dans son rapport de mai 2011 (actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras). En accord avec les valeurs données par l'agence internationale ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids), les taux recommandés sont de : 2% des apports énergétiques (AE) pour l'acide linoléique, 0,8% des AE pour l'acide α linoléique et 0,1% pour l'acide docosahexaénoïque. Cependant, malgré les recommandations, la plupart des régimes occidentaux contiennent une trop grande quantité de certains AGs, en particulier les AGs saturés.

Il est donc très important pour les animaux, de pouvoir percevoir ces AGs pour les détecter et ainsi consommer le taux d'AGs adéquat pour l'organisme.

1.3.2 La perception des AGs chez les mammifères

Plusieurs études se sont intéressées à la perception des AGs chez les mammifères, en particulier chez les humains et les rongeurs (Johnson et al. 1999, Tsuruta et al. 1999, Rolls, Kringelbach and de Araujo 2003, Kadohisa, Verhagen and Rolls 2005). Les rats, confrontés à différents AGs, montrent une préférence pour les AGs libres et plus particulièrement pour l'acide linoléique lorsqu'il est présenté en test de choix avec de l'acide linoléique et pour

l'acide linoléique lorsqu'il est présenté avec l'acide oléique (Tsuruta et al. 1999). La composante olfactive des AGs pouvant fausser les résultats, Fukuwatari *et al* ont refait un certains nombres d'expérimentations avec des rats anosmiques auxquels ils ont proposé de l'acide oléique. Ils ont ainsi pu démontrer la composante gustative des AGs (Fukuwatari et al. 2003).

Les êtres humains, quant à eux, sont capables de détecter les acides stéarique, oléique et linoléique (Chale-Rush, Burgess and Mattes 2007). Yu *et al* ont démontré que les AGs seraient irritants pour les rats et stimuleraient les nocirécepteurs du nerf trigéminal (Yu et al. 2007). Depuis quelques années, il est établi que les neurones hypothalamiques dont le rôle est de déterminer le taux de glucose, sont également sensibles aux AGs libres (Loftus et al. 2000, Kumar et al. 2002). En effet, l'inhibition de l'enzyme Fatty Acid Synthase (FAS) présente dans ces neurones, inhibe la prise alimentaire, diminue le poids et réduit significativement l'expression par l'hypothalamus du neuropeptide Y, un neuropeptide orexigénique.

Plusieurs récepteurs aux AGs ont été trouvés chez les mammifères. On trouve sur les cellules du goût des rats, des DRKs (Delayed Rectifying Potassium channels) qui lient les AGs polyinsaturés ce qui conduit à une dépolarisation des cellules (Gilbertson et al. 1997). Un autre récepteur lie les AGs, le récepteur CD36 (Cluster of Differentiation 36), un récepteur scavenger. CD36 possède une haute affinité pour les AGs (Baillie, Coburn and Abumrad 1996) Les souris CD36 KO ne montrent plus de préférence vis-à-vis de l'acide linoléique. Lorsque l'on dépose des AGs sur la langue de souris sauvages, ayant subi une ligation de l'œsophage permettant d'éviter l'ingestion, on constate une augmentation rapide du flux biliaire et une augmentation du contenu protéique des sécrétions pancréatiques. L'augmentation du flux est dépendante de la longueur de la chaîne carbonée de l'AG et du nombre d'insaturations (Laugerette et al. 2005). De plus, il a été montré que les cellules exprimant CD36 répondent à l'acide linoléique en augmentant la concentration intracellulaire de calcium et d'inositol-triphosphate (Gaillard et al. 2008) mais également par la phosphorylation d'une kinase et relargage de neurotransmetteurs, comme la noradrénaline, qui interviennent dans l'apprentissage (El-Yassimi et al. 2008).

D'autres récepteurs liant les AGs, les GPCRs, ont été mis en évidence chez les rongeurs. La famille GPR 40 et le GPR 120 sont exprimés dans les bourgeons du goût sur la langue, le cerveau et le pancréas pour les GPRs 40 et les intestins pour le GPR 120 ; selon leur type, ils sont activés par les AGs de C1 à C22 saturés ou insaturés (Briscoe et al. 2003, Brown et al. 2003, Le Poul et al. 2003, Hirasawa et al. 2005, Cartoni et al. 2010).

Récemment, il a été découvert un nouveau récepteur, le TRPM5 (Transient Receptor Potential Channel Type M5), qui agit en tant que récepteur de l'acide linoléique et est exprimé par les cellules rénales et dans les bourgeons du goût sur la langue des souris. Comparées à des souris sauvages, les souris TRPM5 KO ne montrent plus de préférence pour l'acide linoléique (Liu et al. 2011).

1.3.3 La perception des AGs chez les insectes

Plusieurs études se sont intéressées à la perception des AGs par les insectes.

Partant du constat que les moustiques préféraient certains individus à d'autres (Lindsay et al. 1993), il a été émis l'hypothèse de l'existence de kairomones humaines. Il a été montré que ces insectes étaient particulièrement attirés par le CO₂ (Gillies and Wilkes 1972) l'acide lactique et certains AGs comme, par exemple, l'acide myristique ou l'acide nonadécylique (Knols and DeJong 1996, Bosch, Geier and Boeckh 2000, Smallegange et al. 2009). Cependant, des études électrophysiologiques ont montré que les neurones olfactifs des antennes d'*Anopheles aegypti* et d'*Anopheles gambiae* ne répondaient pas aux mêmes AGs: du C3:0 à C6:0, l'acide pélargonique et l'acide stéarique pour d'*A. aegypti*, et du C5:0 à C10:0 et l'acide laurique en ce qui concerne *A. gambiae* (Lacher 1967, Qiu et al. 2006).

Les AGs sont également attractants ou répulsifs pour d'autres insectes hématophages comme, par exemple, la punaise *Triatoma infestans*, qui est attirée par les AGs à courtes chaînes (du C3:0 à C5:0) (Barrozo and Lazzari 2004), les tiques *Boophilus microplus* et *Ixodes ricinus* qui répondent préférentiellement à des mélanges d'AGs avec des chaînes carbonnées allant de C15:0 à C17:0 (Osterkamp et al. 1999). Les mouches *Musca domestica*, *Haematobia irritans* et *Stomoxys calcitrans* sont repoussées par les AGs allant de C8:0 à C10:0 (Mullens, Reifenrath and Butler 2009).

Chez les drosophiles, les rares études qui ont été effectuées mettent en évidence le rôle des AGs dans le phénomène d'émigration. En effet, les drosophiles adultes émettent des substances différentes selon les espèces. Ces substances sont des AGs, comme l'acide palmitique et oléique (Narise and Narise 1991).

Cependant, aucune autre étude n'a été effectuée concernant la perception des AGs chez la drosophile. Pourtant l'homologue du récepteur CD 36 chez les insectes a été découvert. Il

s'agit de la protéine Snmp (Sensory Neuron Membran Protein). Cette protéine a été initialement décrite dans les neurones olfactifs du lépidoptère *Antheraea polyphemus* (Rogers et al. 1997) puis chez de nombreux insectes (Nichols and Vogt 2008, Vogt et al. 2009). Chez les insectes, il existe plusieurs types de Snmp, notamment, Snmp1 et 2 qui ont des profils d'expression différents (Forstner et al. 2008). Alors que Snmp1 est exprimée dans les neurones olfactifs, Snmp2 est exprimé dans les cellules accessoires des neurones. Chez la drosophile, Snmp1 est impliqué dans la perception du *cis*-vaccenyl acétate (cVA), phéromone mâle dérivée d'AG (Benton, Vannice and Vosshall 2007). Snmp1 interagirait directement avec la phéromone et permettrait son interaction avec le récepteur olfactif Or67d (Benton et al. 2007), ou agirait en tant qu'inhibiteur agissant au sein d'un complexe contenant ce récepteur olfactif (Jin, Ha and Smith 2008).

1.3.4 La synthèse des AGs chez les animaux :

Les AGs sont des molécules particulièrement importantes pour les êtres vivants. Ils servent, non seulement, de réserve d'énergie, mais sont également impliqués dans de nombreuses voies métaboliques en tant que précurseurs d'autres molécules. Certains AGs sont dit indispensables car l'organisme ne peut pas les synthétiser. L'être vivant doit donc les consommer et pour cela, il doit être capable de les percevoir et de les distinguer.

Chez les mammifères, les AGs indispensables sont les AGs $\omega 3$ et $\omega 6$, acide α -linoléique et linoléique. L'acide α -linoléique va être transformé en acide eicosapentanoïque (EPA) grâce à la $\Delta 6$ désaturase puis une élongase et enfin une $\Delta 5$ désaturase. L'EPA va ensuite être transformé en eicosanoïdes et en acide docosahexanoïque (DHA). Ces molécules sont impliquées dans la protection des artères et du cœur, le bon développement du cerveau... Les eicosanoïdes jouent également un rôle anti-inflammatoire et anti-allergique, et interviennent dans la réponse immunitaire. Ils jouent un rôle dans l'agrégation des plaquettes, la croissance cellulaire et la différenciation cellulaire (Larsson et al. 2004b). De récentes études démontrent que l'acide α -linoléique préviendrait aussi des cancers (Gong et al. 2010, Murff et al. 2011, Gleissman, Johnsen and Kogner 2010) et aurait une action anti-inflammatoire en inhibant le facteur nucléaire NF- κ B (Zhao et al. 2005, Katsoulis et al. 2009, Huang and Ebersole 2010). Cet AG agirait aussi par compétition avec l'acide linoléique, réduisant la production d'acide arachidonique et des eicosanoïdes pro-inflammatoires. En effet, l'acide linoléique va être transformé en acide γ -linoléique grâce à

une $\Delta 6$ désaturase puis il sera transformé en acide arachidonique par une élongase et une $\Delta 5$ désaturase. L'acide arachidonique sera ensuite transformé en eicosanoïdes qui ont une action pro-inflammatoire (Cowing and Saker 2001, Calder and Grimble 2002). L'acide α -linoléique permettrait de réduire leurs productions et donc leurs effets sur la santé.

Un schéma récapitulatif est présenté figure I3.

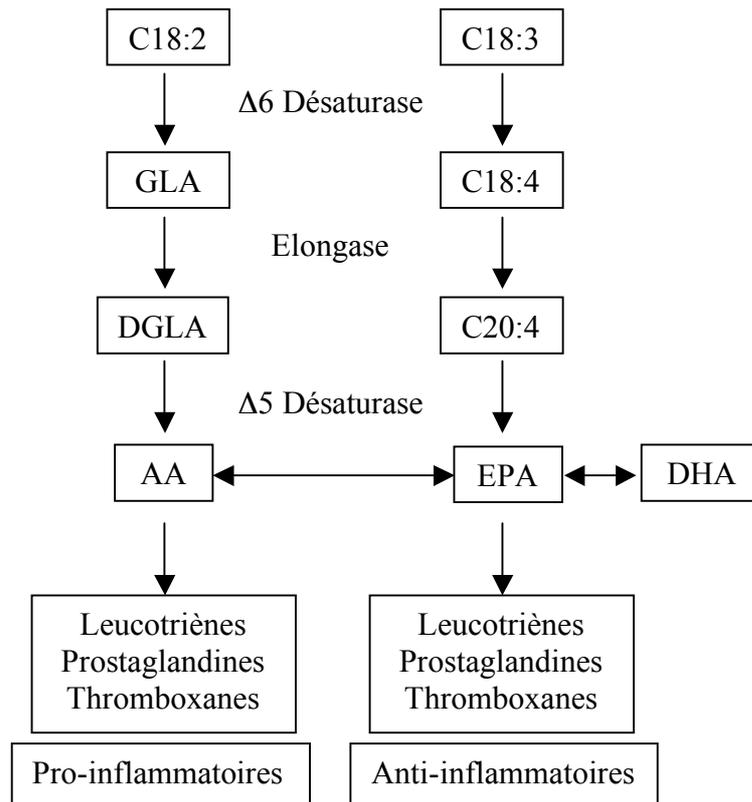


Figure I3 : Schéma récapitulatif du métabolisme des $\omega 3$ et $\omega 6$ en éicosanoïdes. GLA : acide γ linoléique; DGLA : acide dihomog- γ linoléique; AA : acide arachidonique ; EPA : acide éicosapentanoïque; DHA : acide docosahéxanoïque.

Chez les insectes, les AGs indispensables sont différents de ceux des mammifères. Il existe une diversité des AGs essentiels selon les différentes espèces. En effet, de nombreux insectes sont capables de synthétiser l'acide linoléique grâce à une $\Delta 12$ désaturase leur permettant de convertir l'acide oléique en acide linoléique (Derenobales et al. 1987) puis de transformer cet AG en acide linoléique (Jurenka, Derenobales and Blomquist 1987). Chez d'autres insectes comme le moustique, l'AG essentiel est l'acide arachidonique. Cet insecte ne peut apparemment ni synthétiser ni allonger des chaînes d'AGs possédant 18 carbones di ou

tri-insaturées (Dadd and Kleinjan 1979). Certaines espèces, comme *Galleria mellonella* ont besoin d'acide linoléique ou linoléique afin de les allonger pour synthétiser des AGs possédant 20 carbones dans leur chaîne (Dadd 1983). Par contre, les pucerons peuvent être élevés sur un milieu dépourvu en AGs pendant plusieurs générations sans que cela n'altère leur développement (Douglas 1998).

Chez les drosophiles, il n'y aurait pas de synthèse d'AGs polyinsaturés. Une étude a montré que des drosophiles élevées pendant 10 générations sur un milieu dépourvu de ces AGs n'affectait pas leur développement (Rapport, Stanleysamuelson and Dadd 1984). Ces insectes sont cependant capables de synthétiser certains AGs comme les acides laurique, myristique et stéarique grâce à l'action d'une Fatty Acid Synthase sur le malonyl-CoA (Derenobales and Blomquist 1984). L'acide oléique est synthétisé par la Cyp4g1 à partir de l'acide stéarique (Gutierrez et al. 2007).

Plusieurs études ont déterminé les taux d'AGs présents lors du développement des drosophiles (Green and Geer 1979, Larsenrapport 1986, Kunte, Matthews and Rawson 2006). La composition varie selon le développement et le sexe. Globalement, avec l'âge, la concentration en acide myristique augmente alors que les concentrations en acide palmitique et oléique diminuent. Lors de la vie larvaire, la composition en lipides varie de façon importante, passant de 6% du poids total à 15% avant la pupaison (Church and Robertso.Fw 1966). Ces résultats sont à prendre avec beaucoup de précautions car des études ont montré que certains facteurs, comme la température ou la composition du milieu, influençaient la composition en AGs des individus (Geer and Perille 1977, Stark et al. 1993). Si la température diminue, cela favorise la synthèse d'AGs monoinsaturés. Une augmentation du taux de glucose dans le milieu d'élevage provoque une augmentation de l'activité de la $\Delta 9$ désaturase. Il s'en suit une augmentation du taux de l'acide palmitoléique et une diminution du taux d'acide linoléique (Geer and Perille 1977). Si on ajoute des AGs dans la nourriture, la composition en AG des drosophiles varie également (Stark et al. 1993). Si on enrichi le milieu en méthyl-linoléate jusqu'à obtenir une concentration finale de 1,9%, le taux d'acide linoléique dans les mouches varie de 2,6 à 48,3% (Draper et al. 2000).

Certains AGs peuvent avoir également un rôle non négligeable. Un cas extrême se produit lorsqu'on augmente la concentration du milieu en acide oléique. Jowett et Sang (1979) ont remarqué des transformations homéotiques qui transformaient les antennes en pattes (Jowett and Sang 1979). Dans d'autres cas, l'acide oléique apporté dans la nourriture est primordial pour la survie de plus de 80% des drosophiles mutantes homozygotes pour le gène dSREBP (drosophila Sterol Regulatory Element Binding Protein). Ce gène code des facteurs de

transcriptions cruciaux pour une synthèse normale des lipides dans les cellules animales. Or les mutants pour ce gène meurent avant le stade L3, possèdent des défauts de croissance tout en ayant une composition en AGs similaire à celle des drosophiles sauvages. Les larves mutantes pour ce gène sont donc auxotrophes pour les AGs. Si l'on mute les adultes pour ce gène grâce à une expression temporaire induite par le système UAS-Gal4 chez les larves, les adultes mutés survivent (Kunte et al. 2006). Cette protéine se trouve dans le corps gras, les oenocytes, le système digestif et l'appareil excréteur situé à l'extrémité postérieure (ring gland) des larves; chez les adultes, elle ne se trouve que dans les oenocytes et l'appareil éjaculateur.

1.3.5 La relation entre les AGs et le métabolisme

Comme nous venons de le voir, les AGs sont des molécules indispensables liées à de nombreuses voies métaboliques chez les insectes et les vertébrés.

Les phéromones des insectes sont des molécules dérivées des AGs, qui peuvent induire l'agrégation des adultes chez *Drosophila melanogaster* (Wertheim et al. 2002), chez les longicornes (Lacey et al. 2009), chez les larves de doryphores (Hammock, Vinyard and Dickens 2007) et de triatomidés (Figueiras et al. 2009) ou encore de papillons (Jumean et al. 2011). L'émission de phéromones d'agrégation chez les adultes, en réponse à une source de nourriture, a été étudiée chez les *Ips* et les *Dendroctonus* (Symonds and Elgar 2004). Il existe également une phéromone d'agrégation chez *Drosophila melanogaster*, le *cis*-vaccenyl acétate (Bartelt, Schaner and Jackson 1985). Les drosophiles adultes se regroupent sous l'effet de cette phéromone émise par les mâles et combinée aux molécules volatiles de la nourriture.

Chez *D. melanogaster*, les hydrocarbures cuticulaires, constituant la phéromone sexuelle, sont des dérivés d'AGs. Ces molécules sont produites à partir d'acides myristique et palmitique. Les désaturases ajoutent une double liaison à une position précise de la chaîne carbonée. Desat1 va ajouter une double liaison sur l'acide palmitique en position 7 et Desat2 va ajouter une double liaison sur l'acide myristique en position 5 (Wicker-Thomas, Henriot and Dallerac 1997, Dallerac et al. 2000). Des élongases interviennent ensuite afin d'allonger la chaîne carbonée. Un schéma représentant la biosynthèse des hydrocarbures cuticulaires chez la drosophile est présenté figure I4.

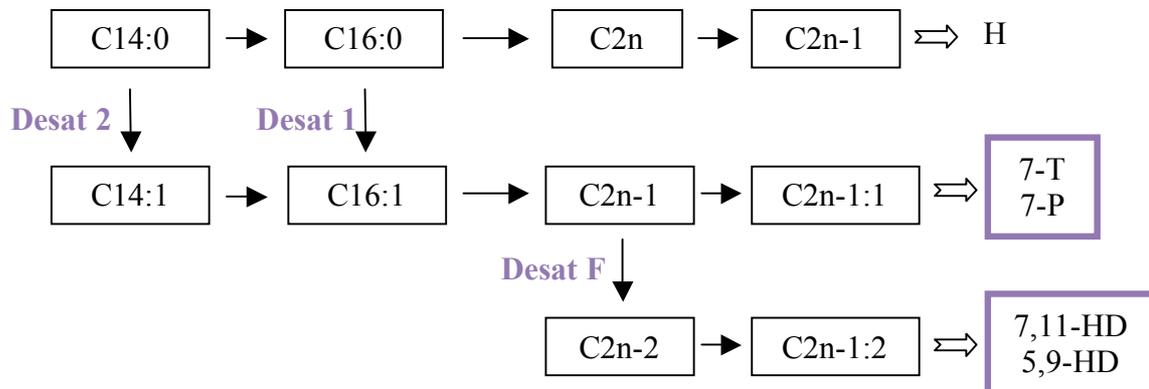


Figure I4 : Schéma représentant la biosynthèse des hydrocarbures cuticulaires chez la drosophile. H : hydrocarbures saturés (aucun rôle phéromonal) ; 7-T : 7-tricosène ; 7-P : 7 pentacosène ; 7,11-HD : 7,11-heptacosadiène ; 5,9-HD : 5,9-heptacosadiène (d'après Dallerac et al. 2000).

Il a été démontré que Desat1 jouait, non seulement un rôle dans le métabolisme et dans l'émission, mais également dans la perception des phéromones (Marcillac, Grosjean and Ferveur 2005b); du fait de la ressemblance structurelle des molécules hydrocarbonées et de celle des AGs, on pourrait supposer que Desat1 pourrait être également impliquée dans la perception des AGs. Une autre protéine, CheB42a, est également connue pour être impliquée dans la perception des phéromones. Cette protéine, exprimée dans les cellules accessoires de 10 soies gustatives des pattes T1 du mâle, est indispensable pour induire la parade sexuelle. Elle permet la détection gustative des hydrocarbures cuticulaires (Xu et al. 2002, Svetec and Ferveur 2005, Park et al. 2006).

D'autres insectes possèdent également des désaturases leur permettant de produire des phéromones à partir d'AGs (Hashimoto et al. 2008). C'est par exemple le cas des papillons qui utilisent également l'acide palmitique et oléique (Foster and Roelofs 1988a, Foster and Roelofs 1988b).

Les mammifères utilisent des dérivés de protéines pour synthétiser des phéromones mais également des AGs insaturés leur permettant de produire par exemple l'(E)-3-méthyl-2 hexanoïc acid, composé présent dans la sueur des êtres humains et ayant un rôle hypothétique d'aphrodisiaque (Brennan and Zufall 2006, Zeng et al. 1991).

Les AGs ont également de nombreuses autres fonctions. Ainsi, une corrélation a été faite entre les taux de sucres et de lipides chez les insectes (Raubenheimer and Simpson 1999) ou chez les vertébrés (Simpson and Raubenheimer 2005). Chez les rats, les AGs sont très importants lors d'une période de jeûne; ils jouent un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline en modulant la sensibilité à cette molécule durant le jeûne et la prise alimentaire durant la re-nutrition des individus (Marsollier et al. 2008). Les AGs libres stimulent la protéine GPR120 ce qui a pour conséquence la sécrétion de GLP-1, augmentant ainsi le taux d'insuline circulant *in vitro* et *in vivo* (Hirasawa et al. 2005). Chez les drosophiles, une alimentation riche en lipides (huile de noix de coco) provoque une dérégulation du signal insuline-TOR et a pour conséquence diverses pathologies métaboliques. Les mouches deviennent obèses et ont des problèmes cardiaques. Ces insectes accumulent les lipides de façon dose-dépendante; plus le milieu contient de lipides, plus les individus en accumulent dans leurs tissus. De plus, ces insectes possèdent une homéostasie de l'insuline perturbée (Birse et al. 2010). Or l'insuline joue un rôle important dans la recherche de nourriture chez la drosophile. En effet, le taux d'insuline circulant, conjugué à l'action d'un neuropeptide (short NeuroPeptide F), module la sensibilité olfactive des ORNs (Root et al. 2011).

Le taux d'AGs libres circulant est également, à lui seul, un paramètre pris en compte par les neurones, ce qui permet à l'organisme de déterminer le statut nutritionnel afin de réguler la prise alimentaire. Ainsi, chez les mammifères, l'ajout d'acide oléique dans l'appareil circulatoire supprime la prise alimentaire (Coccurello et al. 2010).

De récentes études révèlent que les AGs pourraient influencer le phénomène de mémorisation. Chez les êtres humains, un apport en acides gras essentiels chez des enfants souffrant de trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité permet une meilleure qualité de sommeil et une meilleure mémorisation des informations (Yehuda, Rabinovitz-Shenkar and Carasso 2011).

Chez la drosophile, l'expression de Fabp (Fatty Acid Binding Protein) est basée sur le rythme circadien. Lorsque l'expression de cette protéine est augmentée, comparé à des insectes témoins, les drosophiles dorment plus pendant la journée tout en augmentant la mémoire à long terme (Gerstner et al. 2011).

Bien qu'on ne sache que très peu de choses sur les mécanismes de perception des AGs, tous ces exemples prouvent à quel point ces molécules sont importantes et jouent des rôles essentiels chez les êtres vivants. C'est pourquoi, lors de cette thèse, nous nous sommes

intéressés à ce phénomène en utilisant comme modèle, la drosophile *Drosophila melanogaster*, pour tenter de répondre à quelques questions liées à la perception des AGs et aux mécanismes impliqués dans leur détection pré-ingestive.

L'objectif de cette thèse est d'étudier la réponse des larves et des adultes de drosophiles mis en présence d'AGs et de caractériser quelques facteurs biologiques sous-jacents à la modulation de cette réponse.

Pour commencer à répondre à ces questions, nous avons tout d'abord effectué des tests basiques afin de mettre en évidence un comportement larvaire associé aux différents AGs testés. Comme les AGs font partis de leur régime alimentaire, on a émis l'hypothèse qu'elles étaient capables de les reconnaître et éventuellement de les distinguer selon leurs propriétés physico-chimique tel que la longueur de la chaîne carbonée ou encore la présence d'insaturations.

Puis nous avons détaillé un peu plus ces comportements, ce qui nous a permis de mettre en évidence une composante olfactive et une composante gustative des AGs.

Comme les phéromones sont des molécules structurellement très proches des AGs, nous avons testé des larves mutantes pour certains gènes, les gènes *desat1*, et *CheB42a* qui sont impliqués dans la perception des phéromones, afin de vérifier le potentiel lien entre la perception des AGs et des phéromones.

Quelle influence a le milieu sur lequel sont élevées les drosophiles sur la perception des AGs ? Une lignée élevée depuis plusieurs générations sur un milieu carencé en AGs a été testée pour répondre à cette question.

Les besoins métaboliques changeant au cours de la vie, notamment lors du passage de la vie larvaire à la vie adulte, on peut se demander si les préférences pour les AGs changent également au cours de la vie de l'insecte. Pour tenter de répondre à cette question, des tests ont été effectués sur les adultes, avec les mêmes AGs que ceux testés chez les larves.

Ces travaux pourront peut-être, à terme, permettre de mieux comprendre comment son perçus les AGs chez les mammifères et, en particulier chez l'Homme, et pourront peut-être alors contribuer à mieux comprendre le lien entre AGs et le problème de santé publique qu'est l'obésité.

Matériels et méthodes

2.1 Les AGs utilisés

Au cours de notre travail, nous avons utilisé six AGs:

* 3 AGs saturés (pas de double liaison): l'acide myristique (C14:0), l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0)

*3 AGs insaturés, possédant une ou plusieurs double(s) liaison(s): l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3).

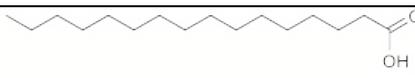
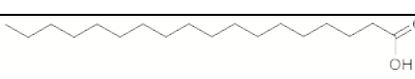
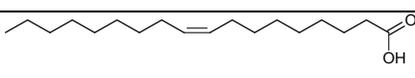
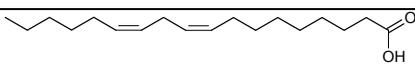
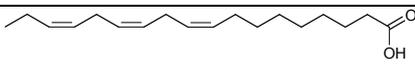
nom usuel	nom IUPAC	formule chimique	structure chimique	masse molaire en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Acide myristique	Acide tétradécanoïque	C14:0		228,37
Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	C16:0		256,42
Acide stéarique	Acide octadécanoïque	C18:0		284,48
Acide oléique	Acide cis-9-octadécénoïque	C18:1 ω -9		282,46
Acide linoléique	Acide cis-9-12-octadécadiénoïque	C18:2 ω -6		280,44
Acide α linoléique	Acide cis-9-12-15-octadécatriénoïque	C18:3 ω -3		278,43

Tableau M1 : Tableau récapitulatif des AGs utilisés.

Tous les AGs testés proviennent de la société Interchim (Montluçon, France) et sont purs à plus de 98%.

2.2 Les différents milieux d'élevage

Les mouches sont toutes élevées sur un milieu standard témoin ou carencé en acides gras. Elles sont soumises à un cycle jour-nuit de 12h et gardées à 25°C à une humidité relative de $65 \pm 5\%$.

Composition du milieu d'élevage témoin

- 6500 ml d'eau distillée,
- 425 g de farine de maïs,
- 425 g de levure de bière,
- 60 g d'agar,
- 200 ml d'antifongique (méthyl-4-hydroxybenzoate à 1/1000 dans de l'éthanol à 95%).

Composition du milieu carencé en acides gras

- 2200 ml d'eau distillée,
- 330 g de purée en flocons (Carrefour discount, 0,5g de lipides pour 100g, dont 0,4g de saturés)
- 100 ml d'antifongique (méthyl-4-hydroxybenzoate à 1/1000 dans de l'éthanol à 95%).

Au laboratoire, nous avons pu déterminer la quantité d'acides gras libres présents dans le milieu (JP farine, communication personnelle)

AG	Milieu témoin	Milieu carencé
C14:0	2,62	3,28
C16:0	21,88	6,26
C18:0	2,72	0,99
C18:1	8,98	1,01
C18:2	86,18	2,52
C18:3	4,38	1,06

Tableau M2: Quantité d'AGs ($\mu\text{g/g}$ milieu) dans les différents milieux d'élevage.

2.3 Les différentes lignées de drosophiles utilisées

Plusieurs lignées de drosophiles ont été utilisées lors de nos expériences:

*Dijon 2000 (Di2): lignée sauvage récoltée aux environs de Dijon en 2000 par Jean-François Ferveur, et gardée au laboratoire depuis cette date sur milieu d'élevage standard.

*Canton-S (CS): lignée sauvage d'origine nord américaine et fréquemment utilisée comme souche témoin.

*Desat 1 (1573): lignée mutante pour le gène *desat1* codant pour une $\Delta 9$ -desaturase. Elle a été obtenue au laboratoire à partir de la lignée CS en insérant, entre deux régions promotrices, un élément P-GawB (Gal4) dans ce gène, (Marcillac et al. 2005a, Marcillac et al. 2005b). Cette lignée a été construite au laboratoire.

*N2: lignée de type sauvage obtenue par une excision totale et précise de l'élément P-GawB (Gal4) initialement inséré dans la lignée Desat 1. Cette lignée a été construite au laboratoire.

*33 338: lignée provenant de la société VDRC ($w^{1118}; P\{GD1950\}v33338$; Vienna Drosophila RNAi Center, Vienne, Autriche) et possédant un gène codant pour l'ARNi-UAS-*desat1* (UAS-RNAi *desat1*). En la croisant avec différentes lignées possédant la séquence Gal4, cela permet de synthétiser des petits ARNi contre l'ARNm synthétisé à partir du gène *desat1*. Ceux-ci vont alors être détruits par la protéine Dicer ce qui diminuera fortement l'expression de Desat1.

*RA-Gal4, RC-Gal4, RE-Gal4, RB-Gal4, RD-Gal4 et RDio-Gal4: lignées homozygotes provenant de la lignée Desat 1. L'élément Gal4 a été inséré dans les différentes régions cis-régulatrices (RA, RC, RE, RB, RD et RDio) du gène *desat1*. Ces régions 5' cis-régulatrices sont les promoteurs alternatifs permettant l'expression différentielle de la $\Delta 9$ -desaturase dans divers tissus. L'expression de Desat1 sera alors pilotée dans différents tissus (annexe A3). Ces lignées ont été obtenues par F. Bousquet au laboratoire. Un schéma du gène et de sa région promotrice est présenté ci-dessous.

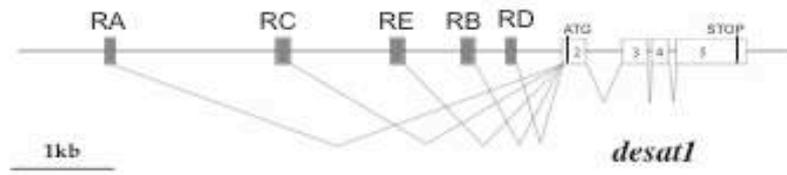


Figure M3 : Schéma de la région promotrice du gène *desat1* de *Drosophila melanogaster*. (D'après Bousquet et al. en révision)

Elav-Gal4 (Elav) : lignée transgénique possédant la séquence Gal4 (lignée 8760, w[]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3; Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University, US). La protéine Elav est spécifique du système nerveux (Robinow and White 1988). Elle est requise pour la différenciation du système nerveux ainsi que son maintien (Robinow and White 1991).

UAS-GFP : lignée transgénique possédant la séquence UAS-GFP (lignée 5130, y[1] w[]; Pin[Yt]/CyO; P{UAS-mCD8::GFP.L}LL6 ; Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University, US).

*CheB42a-Gal4 (B42): lignée transgénique homozygote possédant, deux transgènes, CheB42a-Gal4 et UAS-GFP, insérés sur le chromosome 3. Il a été montré que cette lignée possédant le transgène CheB42a-Gal4 possède des problèmes de perception des phéromones (Xu 2002) (Svetec and Ferveur 2005).

2.4 Les individus testés

Tous nos tests ont été réalisés sur des larves obtenues à partir d'adultes âgés de 4 à 5 jours ou sur des adultes âgés de 3 à 4 jours. Les larves sont prises au début du stade L3, soit le début du troisième stade larvaire. Tous les tests statistiques ont été effectués avec XLSTAT 2011 (Addinsoft, 2011) sous Excel 2011 et Mac 10.6.6.

2.4.1 Les tests comportementaux sur les larves

2.4.1.1 Récolte des larves de drosophiles

Vingt-cinq mâles et 25 femelles adultes, âgés de 4 à 5 jours, sont prélevés dans l'élevage de masse puis mis à pondre dans un tube contenant du milieu frais pendant 4h. Les adultes sont alors retirés et les tubes sont maintenus dans les conditions standard (photopériode de 12h j ; 24-25°C et 65±5% d'humidité relative) pendant 4 jours. Les larves ainsi obtenues seront alors au début du dernier stade larvaire (troisième stade - L3). Ces larves, dont le seul but est de se nourrir afin d'accumuler des réserves, sont faciles à manipuler et seront utilisées pour nos tests.

2.4.1.2 Tests d'attraction

L'arène de test utilisée est une boîte de Pétri en verre (Ø 9 cm) dont le fond est recouvert d'un papier filtre Whatman (Cat No 1442 090) sur lequel on a dessiné au crayon de papier 3 zones circulaires disposées en Y; chacune des zones représente 10% de la surface totale de l'arène.

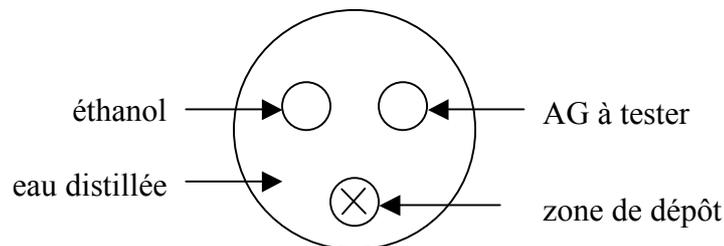


Figure M4 : Schéma du test d'attraction.

Les AGs, non solubles dans l'eau, sont dilués dans l'éthanol absolu afin d'obtenir les différentes concentrations testées, soit, 10, 100, 200 et 500 μg pour 50 μl d'éthanol (50 μl de liquide sont nécessaires pour recouvrir une zone de test). Les concentrations correspondantes seront notées conc 0,2, conc 2, conc 8 et conc 10 dans la partie Résultats. Des tests préliminaires avec des concentrations plus élevées nous ont permis de déterminer que 500 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ était la concentration maximale pour obtenir une réponse phénotypique optimale. On dépose sur une des zones du papier 50 μl de solution à tester. Une fois l'éthanol évaporé (3 minutes environ à température de la salle de test, soit 24-25°C), on place le papier filtre dans la boîte de Pétri. On ajoute alors 1ml d'eau distillée (volume suffisant pour humidifier tout le papier) afin que les larves puissent se déplacer facilement et ne se déshydratent pas.

Pendant que l'éthanol s'évapore, on rince 10 larves à l'eau distillée afin d'éliminer toutes traces de milieu. Les larves sont alors placées dans un verre de montre à l'aide d'un fin pinceau. Elles seront toutes déposées en même temps dans la zone de départ. On referme alors la boîte à l'aide d'un couvercle en verre. Les larves présentes sur l'une ou l'autre des zones de test sont comptabilisées au bout de 5, 10, 15, 20 et 30 minutes. Les tests témoins consistent en 2 zones d'éthanol évaporé. Pour chaque AG, à chaque concentration, on réalise 10 tests. Puis les résultats obtenus sont comparés grâce à un test de χ^2 . Les différences entre l'AG testé et la valeur obtenue grâce à un test témoin opposant 2 zones d'éthanol, représentée par des pointillés sur les graphiques (éthanol évaporé, noté éthanol), sont significatives si une ou plusieurs étoile(s) est/sont dessinée(s) sur l'histogramme. Pour 1 étoile, $p=0,05$; pour 2 étoiles, $p=0,01$; pour 3 étoiles, $p=0,001$ et pour 4 étoiles, $p<10^{-4}$.

2.4.1.3 Suivi individuel des larves (trajectométrie)

Afin de vérifier si les larves testées sont véritablement attirées à courte distance (3 cm environ entre la zone de départ et la zone de test), nous avons enregistré leur déplacement. Le dispositif expérimental utilisé est le même que celui décrit précédemment mais on ne dépose qu'une seule larve sur la zone de départ afin de suivre en détail son trajet. Des photos de la larve sont prises toutes les 5 secondes pendant 10 minutes (Canon EOS 1000D, éclairage : 3000K). Grâce au logiciel Adobe Photoshop CS5, le trajet de chaque larve est reconstitué image par image. On peut alors calculer le temps passé par la larve sur chaque zone puisque chaque photo représente 5 secondes.

On réalise 20 tests pour les témoins (on ne dépose rien et/ou 50 μ l d'éthanol dans une, ou les deux zones de dépôt). Après différents essais préliminaires, nous avons testé le pouvoir attractif ($n=10$) de 3 AGs, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique à 500 μ g pour 50 μ l d'éthanol (conc 10). Ces acides gras, à cette concentration, donnent les résultats les plus nets. On calcule la distance parcourue par une larve et son activité locomotrice relative grâce à une échelle basée sur le nombre de pixels (le diamètre de la boîte de Pétri (9 cm) représentant 1 pixel). Ainsi, le nombre de pixels obtenus pour chaque trajet, permet de calculer la distance parcourue par chaque larve en 10 minutes. Pour comparer les distances parcourues des larves sur le papier filtre ou le temps passé sur une zone, en fonction des différents AGs, on réalise un test de Kruskal-Wallis (suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples par paire de Conover et Iman).

Au cours de toutes les expériences, afin d'éviter toute influence de la lumière, les boîtes de Pétri sont tournées les unes par rapport aux autres de 180°.

2.4.1.4 Test de répulsion

Pour ce test, on adopte le même type de dispositif, que pour le test de choix. En revanche, les larves sont disposées directement sur un spot unique sur lequel sera déposé le composé à tester. Une fois la boîte de Pétri refermée, on compte le nombre de larves présentes dans la zone de l'AG toutes les 30 secondes pendant 10 minutes. On réalise 10 tests pour chaque AG, aux 3 plus fortes concentrations (100, 200 et 500 µg pour 50 µl d'éthanol, soit conc 2, conc 4 et conc 10); en effet, des expériences préliminaires ont montré qu'il n'y avait pas de comportement induit par ces AGs à de plus faibles concentrations. Puis on calcule un indice de répulsion, basé sur la médiane du nombre de larves sortant de la zone :

Indice de répulsion = moyenne des médianes des larves sorties de la zone de dépôt.

Un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test post-hoc de comparaisons multiples par paire de Conover et Iman avec correction de Bonferroni effectué sur l'indice de répulsion, permet de comparer les différentes réponses obtenues.

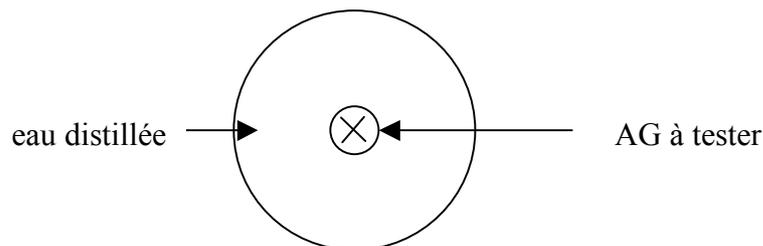


Figure M5 : Schéma du test de répulsion.

Afin de calculer un indice reflétant le phénomène d'agrégation que nous avons pu observer lorsque les larves étaient en contact avec certains AGs, nous avons comptabilisé le nombre de larves présentes dans la zone de l'AG et combien d'entre elles sont en contact. Cet indice calculé comme tel :

IG = somme des contacts inter-individuels établis durant chaque période de 5 secondes.

Deux larves pouvant se trouver en contact par hasard, nous n'avons pris en compte, au minimum, que les groupes de 3 larves, ce qui donnera un indice minimal de 2.

Les tests durent jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de larves dans la zone de dépôt. Le test de Kruskal-Wallis nous permet de comparer les indices de groupe et la durée des groupes (p calculé par la méthode de Monte Carlo avec 100.000 itérations), complété *post-hoc* par une comparaison multiple par paires de Conover-Iman avec correction de Bonferroni.

2.4.1.5 Mesure de l'activité locomotrice des larves

Afin de mesurer l'activité locomotrice des larves, on réalise un test d'attraction consistant en un test témoin alcool vs alcool et en ajoutant un papier avec des carreaux de 0,8 cm de côté sous la boîte de test. On dénombre le nombre de lignes franchies par la larve en 5 minutes. On mesure la locomotion avec 15 larves de chaque lignée puis on les compare grâce à un test de Mann-Whitney.

2.4.1.6 Sélection

On sélectionne les larves Di2 qui sont indifférentes à l'acide stéarique (non repoussées), pendant plusieurs générations. Pour cela, on effectue un test d'attraction avec l'acide stéarique à la plus forte concentration (500µg/50µl, soit conc 10). On dénombre le nombre de larves présentes sur chaque spot à 5, 10, 15, 20 et 30 minutes. Pour chaque génération, on effectue 10 tests. On choisit et sélectionne les larves peu repoussées par cet AG. Elles sont récupérées après les 30 minutes de test, avec un pinceau pour les mettre dans un nouveau tube de milieu (où se trouve du milieu standard). Les tubes sont maintenus dans les conditions standard (photopériode de 12h j ; 24-25°C et 65±5% d'humidité relative). La génération suivante sera testée de la même façon et sélectionnée de nouveau.

2.4.2 Tests comportementaux sur les adultes

2.4.2.1 L'olfactomètre en Y

Afin de tester si les adultes étaient attirés olfactivement par les AGs, nous avons utilisé un labyrinthe en forme de Y.



Photographie M6 : photographie du dispositif de l'olfactomètre en Y.

Les adultes (20 mâles, 20 femelles) âgés de 2 jours, séparés selon leur sexe la veille, sont mis à jeûner 17h avant le test dans un tube contenant un papier humidifié et maintenus à 25°C.

Le test se déroule comme suit: on dépose sur un spot (surface identique à celle des spots de dépôt décrits ci-dessus) tracé au crayon sur un papier filtre, 50µl d'AG à 500µg/50µl (conc 10), et sur un autre papier filtre 50µl d'éthanol absolu. On laisse évaporer l'alcool et on humidifie les papiers filtres avec 1ml d'eau distillée. On découpe alors les zones de dépôt de façon à obtenir un papier mesurant 2,5cm²; on place l'un des papiers test dans un tube (longueur : 9,3 cm, Ø 2,2 cm) et l'autre dans un autre tube. Les tubes sont reliés par un dispositif (téflon) en Y. Dans un troisième tube, on place les 20 adultes à tester. On place ce tube à l'extrémité principale du Y. Le dispositif est a été fait de telle sorte que les adultes attirés par l'odeur provenant de l'une ou l'autre des branches ne puissent ressortir du tube. Les tests témoins consistent en deux papiers filtre où l'on a déposé de l'éthanol absolu.

Après 2h de test, on compte le nombre de drosophiles dans chaque tube. On calcule un indice d'olfaction (IO) comme décrit ci-dessous :

$$IO = (\text{nombre de drosophiles dans le tube contenant l'AG} - \text{nombre de drosophiles dans le tube contenant l'éthanol évaporé}) / \text{nombre total de drosophiles utilisées pour le test}$$

Cela permet de déterminer si les drosophiles sont attirées, indifférentes ou repoussées par l'AG testé.

Chaque test est répété 12 fois. Grâce à un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn (réalisé avec le logiciel Prism version 4), on peut comparer les résultats 2 à 2.

2.4.2.2 PER (Proboscis Extension Reflex)

Afin de déterminer si les AGs pouvaient être reconnus "gustativement" par les adultes, nous avons utilisé le "Proboscis Extension Reflex".

Les adultes utilisés sont âgés de 3 à 4 jours à jeun depuis 20 h (tubes ne contenant que du papier absorbant imbibé d'eau distillée; maintenus à 25°C). Les drosophiles sont anesthésiées par le froid (on place les tubes dans de la glace pilée pendant 3 minutes) puis collées sur le dos sur une lame de verre, grâce à du vernis à ongles incolore. Les mouches sont alors placées dans une chambre humide (boîte de Pétri avec papier humide) pendant 30 minutes.

Le test consiste à placer une substance x sur la patte antérieure (T1), très riche en récepteurs gustatifs. En cas de réponse positive à la substance testée, la mouche étendra son proboscis pour se nourrir. En revanche, si elle ne l'aime pas ou est indifférente à cette substance, le proboscis restera en position de repos.

Dans un premier temps, afin de vérifier si l'individu testé n'a pas soif, on place une goutte d'eau sur la patte T1 grâce à une seringue avec une aiguille. En cas de réponse positive, la mouche ne sera pas testée. Si la mouche n'a aucune réaction, on teste alors une goutte de glucose (100 mM) afin de vérifier que l'extension du proboscis peut se faire correctement. Si aucune extension n'est visible, la mouche ne sera pas testée. Si la mouche répond positivement, on lui représente de l'eau puis, si elle n'étend pas son proboscis, on teste, une fois l'éthanol évaporé, un AG (500 μ g/50 μ l, soit conc 10) déposé sur une petite languette de papier filtre. Le témoin consiste en un papier filtre humidifié.

Les observations préliminaires avec les six AGs seuls (à 500 μ g/50 μ l soit conc 10), ne montrant aucune réponse, nous avons donc testé (double stimulation) l'acide gras en même temps que la solution de glucose: on teste l'eau, puis le glucose, sur une des pattes T1 puis l'eau, le glucose et, après extension du proboscis causée par le glucose, on teste l'acide gras sur l'autre patte T1. Le glucose favorisant l'extension du proboscis, si la mouche le rentre lorsqu'on l'AG est présenté, on peut donc considérer que ce dernier est répulsif vis-à-vis de l'insecte.

Résultats

3.1 Etude de larves témoins élevées sur un milieu témoin

3.1.1 Larves sauvages (Di2 et CS)

3.1.1.1 Tests d'attraction

Dans un premier temps, nous avons observé la réponse de larves sauvages envers différents acides gras purs. Ces larves sont prises au début du stade L3, soit le début du troisième stade larvaire. Nous avons déposé 10 larves provenant d'une lignée témoin (Di2 ou CS) sur un papier filtre, à une distance d'environ 3 cm de la zone où l'on a préalablement déposé un spot d'AG. Puis on a dénombré le nombre de larves présentes sur ce spot d'AG, que l'on a comparé au nombre de larves présentes à ce temps donné sur un spot contrôle d'éthanol absolu (EtOH) d'où il s'est évaporé (noté éthanol par la suite).

On dénombre le nombre de larves présentes sur chaque spot au bout de 5, 10, 15, 20 et 30 minutes. On a effectué ces tests pour six AGs à 3 concentrations : 100µg/50µl soit 2µg/µl (conc 2) ; 200µg/50µl soit 4µg/µl (conc 4) et 500 µg/50µl soit 10µg/µl (conc 10). On a ensuite calculé la moyenne des larves qui se trouvaient sur chaque zone d'intérêt, et ceci pour les 10 tests effectués pour chaque concentration des six AGs testés. Les résultats sont présentés sur la figure R1.

On s'attend à trouver, au hasard, en moyenne, 1 larve sur un spot, puisqu'on a déposé 10 larves et que les spots d'intérêt mesurent 10% de la surface totale du papier filtre. Cependant, en pratique, ce n'est pas une valeur exacte. On a donc représenté en pointillés la valeur « réelle » obtenue statistiquement (0,59) à partir de tests témoins réalisés avec deux spots d'éthanol.

Les tests témoins (éthanol vs éthanol) montrent une répartition homogène des larves sur les 2 spots ce qui indique que l'éthanol évaporé n'a pas d'effet apparent sur le comportement des larves des 2 lignées sauvages. Pour les AGs saturés, on s'aperçoit que les larves ont tendance à être plus souvent présentes sur la zone témoin que sur la zone contenant l'AG. En ce qui concerne les AGs insaturés, les larves y sont significativement plus présentes (surtout à la plus forte concentration testée) que sur le spot d'éthanol. Lors de ces tests, on remarque que les larves ont tendance à rester sur l'AG insaturé sur lequel elles se trouvent, en effectuant des

demi-tours pour retourner sur la zone de l'AG après en être sorties. Le C18:1 aux 2 plus fortes concentrations est significativement attractif pour les larves Di2, alors que pour les larves CS il est attractif à la concentration la plus faible et à la plus forte. Le C18:2 n'est significativement attractif que pour les larves Di2 à la plus forte concentration testée. Le C18:3 est significativement attractif pour les larves Di2 à la concentration la plus faible et à la plus forte. Pour les larves CS, il est attractif aux 2 plus fortes concentrations.

En ce qui concerne les AGs saturés, le C18:0 à la plus forte concentration est significativement répulsif pour les larves Di2, mais n'a pas d'effet sur les larves CS. Le C16:0 en revanche, est significativement répulsif pour les larves CS aux 2 plus fortes concentrations testées, mais n'a pas d'effet sur les larves Di2. Enfin, le C14:0 n'induit aucune réponse significative quelque soit la lignée. Lors des observations, on remarque que les larves font demi-tour lorsqu'elles arrivent sur une zone d'AG saturé, comme pour l'éviter.

À la plus faible concentration (conc 2), peu de larves montrent des réponses marquées envers les différents AGs, d'où l'absence de significativité. Cependant, on peut remarquer que les larves témoins continuent à distinguer clairement les 2 types d'AGs.

Les larves Di2 et CS sont donc significativement attirées par les AGs insaturés et repoussées par les AGs saturés à la plus forte concentration pour le C18:0 pour les larves Di2, et aux 2 plus fortes concentrations pour le C16:0 pour les larves CS.

Les larves témoins montrent donc des réponses claires envers les AGs, de manière dose-dépendante. La répulsion n'étant pas clairement visible avec ce type de test, nous avons effectué un test de répulsion permettant de mieux mettre en évidence le phénomène de répulsion. Les résultats seront décrits dans la partie 3.1.1.3.

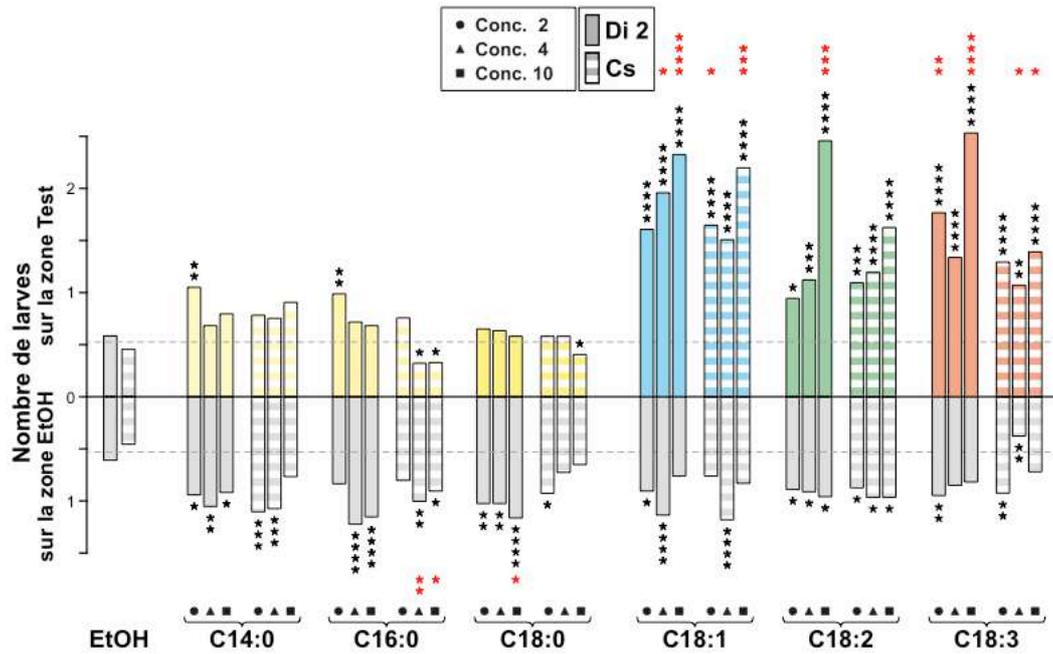


Figure R1: Résultats du test de préférence pour les larves Di2 et CS en fonction des différents AGs testés. La première barre de l’histogramme représente le test témoin, éthanol vs éthanol. Les différents AGs sont représentés en fonction de leur concentration ; la barre de gauche représente les tests effectués avec une concentration de $100\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ (conc 2 = cercle). La barre centrale représente la concentration $200\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ (conc 4 = triangle) et enfin la dernière barre représente la plus forte concentration soit $500\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ (conc 10 = carré). Les étoiles noires indiquent les tests significativement différents de la probabilité « réelle » (ligne pointillée) ; les étoiles rouges indiquent les tests significativement différents entre la zone d’AG et la zone de l’éthanol. Pour *, $p=0,05$; pour **, $p=0,01$; pour ***, $p=0,001$ et pour ****, $p<10^{-4}$. ($\text{Khi}2(35\text{df})=263,5$; $p<10^{-4}$). Pour chaque AG, $n=10$.

3.1.1.2 Suivi individuel des larves témoins

Nous avons choisi de ne tester que la lignée Di2 dont les larves montrent des réponses plus nettes envers les différents AGs testés que les larves CS. Ce suivi individuel permet de déterminer plus précisément le comportement de chaque larve. Cela permet de mesurer des paramètres tels que la distance parcourue, les premier et second choix montrés par la larve (éthanol ou AG), le temps passé sur chaque zone ou encore l’activité locomotrice relative de la larve. Nous nous sommes focalisé sur les trois AGs — C18:0, C18:1 et C18:3 — avec

lesquels les larves montraient des réponses les plus contrastées. Ces AGs ont été utilisés à la concentration la plus élevée (conc 10).

Sur la figure R2 est représentée la distance parcourue par les larves Di2 en fonction des AGs testés. Les larves parcourent plus de chemin lorsqu'elles sont en présence d'AG, qu'il soit saturé (C18:0) ou bien insaturé (C18:1), que lorsqu'il y a eu de l'éthanol évaporé dans l'enceinte de test. Ceci indique bien un effet général des AGs.

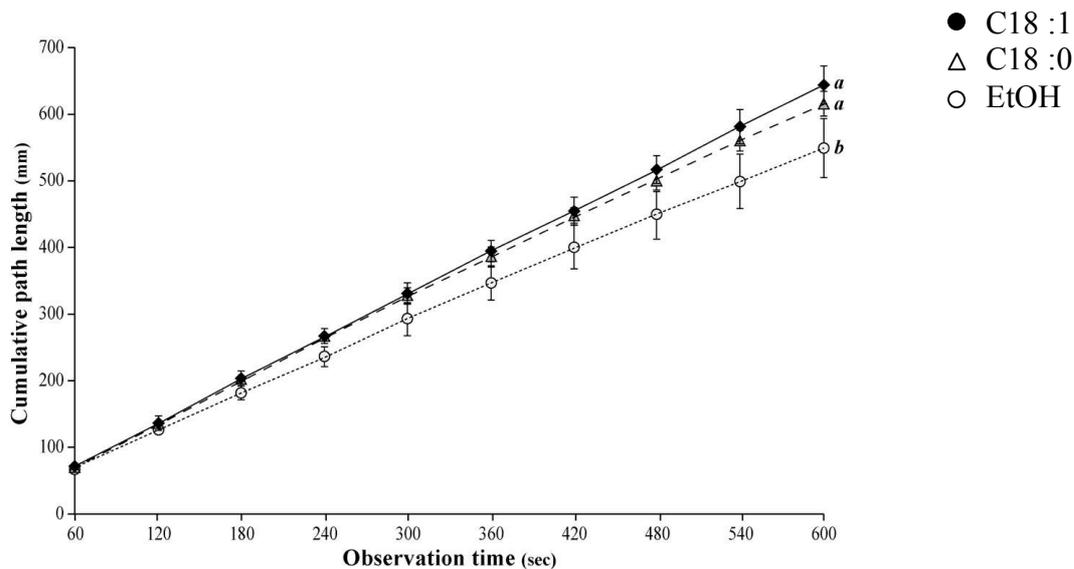


Figure R2 : Représentation du chemin parcouru par les larves Di2, en présence de différents AGs (C18:0 ou C18:1 à conc 10) ou d'éthanol, en fonction du temps. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives (seulement à 600sec). Pour chaque AG, n=10, pour l'éthanol, n=20.

On mesure alors l'activité locomotrice relative des larves en fonction de différents AGs testés (figure R3). Lorsque les larves sont en présence d'éthanol évaporé, l'activité locomotrice relative (ALR) est stable au cours du temps d'observation (10 min). En présence de C18:0, l'ALR est également stable, avec une activité un peu plus élevée au début et en fin de test. En présence de C18:1, l'ALR, élevée au début du test, diminue avec le temps pour croître de nouveau vers la fin du test. Quand les larves sont en présence de C18:0 vs C18:1 ou de C18:3 vs éthanol, l'ALR est faible et stable dans le temps (sauf au début du test pour les tests avec C18:0 vs C18:1 où l'ALR est similaire à celle des témoins). Les larves ont tendance à rester sur l'AG insaturé présent, ce qui expliquerait la faible activité locomotrice relative des larves.

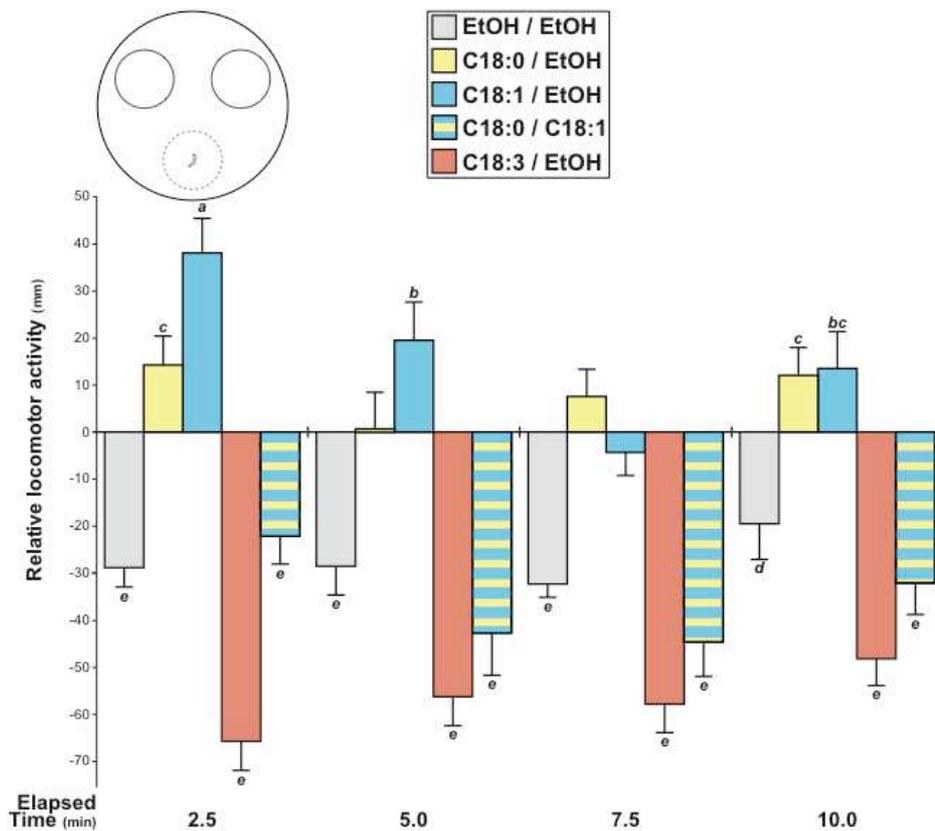


Figure R3 : Représentation de l'activité locomotrice relative des larves Di2 en fonction des AGs testés. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. Pour chaque test, n=10, pour le témoin, n=20.

Un autre paramètre instructif concerne le premier choix fait par les larves dans l'arène de test. Ce paramètre peut nous permettre de détecter un effet olfactif des AGs, avant le premier contact gustatif avec la substance testée. Nous avons aussi regardé si, après cette première visite, les larves revenaient préférentiellement ou non sur le même spot (Seconde visite ; figure R4).

Les larves en situation témoin (éthanol vs éthanol) choisissent un côté aussi bien que l'autre. Il n'y a pas de différence. Lorsqu'elles sont en présence d'un AG (C18:0 ou C18:1), elles ne montrent pas de choix préférentiel, ce qui démontrerait une attirance pour l'AG (test exact de Fisher). Lorsqu'elles sont en présence de C18:0 vs C18:1, il n'y a pas de différence significative. En revanche, lorsque les larves sont en présence de C18:3 vs éthanol, elles se dirigent d'abord préférentiellement sur ce spot d'AG plutôt que sur le témoin éthanol ($p=0,04$), puis y retournent aussi de manière préférentielle pour leur seconde visite ($p=0,002$).

Cet AG est donc bien attractif à distance pour les larves témoins, et ses effets « positifs » pourraient être mémorisés puisqu'elles y retournent par la suite.

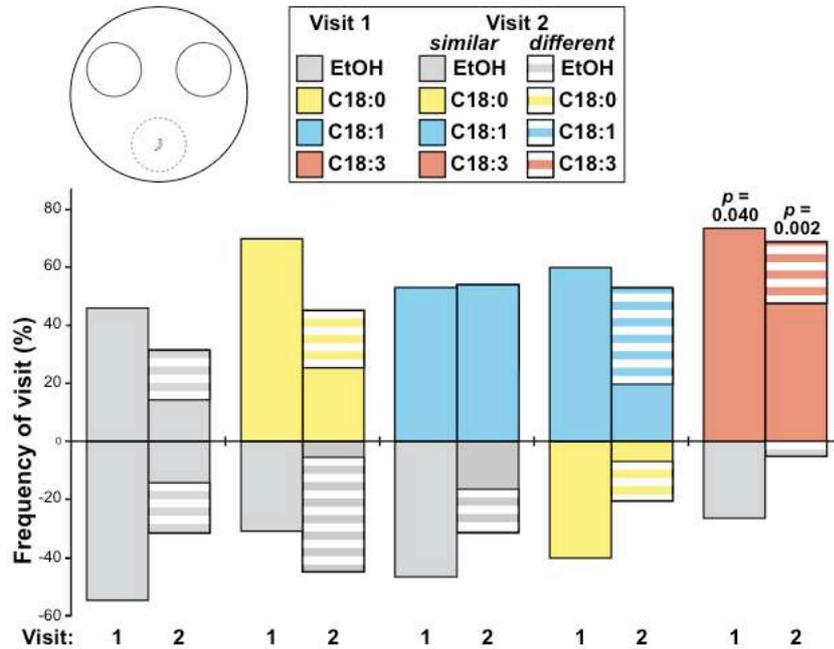


Figure R4 : Représentation graphique du premier et second choix fait par les larves confrontées à un AG vs éthanol ou confrontées à 2 AGs. Pour chaque test, n=10, pour témoin, n=20.

On s'intéresse ensuite au temps relatif passé par la larve sur chaque zone (figure R5). Ce test indique clairement que les larves passent plus de temps sur les AGs que sur l'éthanol. La durée passée augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. Quand les larves sont confrontées à deux AGs, elles passent plus de temps sur l'AG insaturé (C18:1) que sur l'AG saturé (C18:0). En effet, puisqu'elles retournent sur le spot d'AG insaturé, elles passent donc moins de temps sur les autres zones.

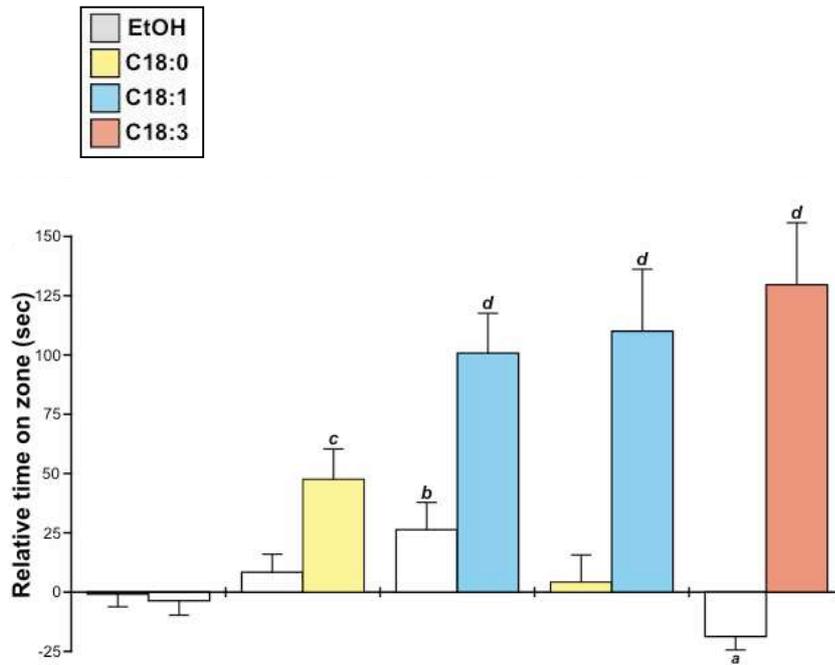


Figure R5 : Temps relatif passé sur les zones d'intérêt par les larves. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. Pour chaque test, n=10, pour le témoin, n=20.

3.1.1.3 Tests de répulsion

Jusqu'à présent, nous avons testé les larves de drosophile dans une situation de choix car elles pouvaient aller ou non sur la zone où était déposée de l'AG pur. Cependant, ce test ne permet pas de mesurer efficacement les phénomènes éventuels de répulsion induits par certaines substances. C'est pourquoi nous avons conçu un nouveau test permettant de mettre en évidence plus concrètement la répulsion des larves (et notamment sur les AGs saturés).

On s'attend à ce que les larves déposées sur un AG saturé partent très vite de la zone de dépôt (qui est celle de l'AG), et qu'au contraire, elles restent longtemps sur un AG insaturé puisque l'on a démontré grâce au test d'attraction, que les AGs saturés étaient répulsifs alors que les AGs insaturés étaient attractifs.

On teste les 2 lignées témoins (Di2 et CS) en présence des mêmes stimuli (six AGs à 3 concentrations) que ceux utilisés dans le test d'attraction (voir ci-dessus). On calcule un indice de répulsion comme décrit dans la partie Matériels et méthodes. En principe, cette mesure permet de mesurer le nombre médian de larves ayant quitté le spot d'intérêt.

La figure R6 montre l'indice de répulsion induit par les différents AGs sur les larves Di2 et Cs.

On note plusieurs valeurs inattendues. En effet, lorsque les larves sont placées sur les acides gras saturés (à la plus forte concentration pour le C14:0 et aux 2 plus fortes concentrations pour le C16:0 et le C18:0), l'indice de répulsion des larves Di2 est faible (peu de larves sortent du spot) et significativement différent de l'indice sur le spot témoin (éthanol). Or on s'attendait à un résultat inverse (un indice de répulsion élevé sur des AGs à effet répulsif). Cependant l'observation plus précise du comportement des larves sur ces AGs, montre qu'elles ont un comportement atypique. Les larves déposées sur un AG saturé forment une « boule », ou une « pyramide ». Cet effet n'est pas observé avec les AGs insaturés (dont les indices de répulsion sont équivalents à ceux des témoins). En effets, les larves placées sur une zone couverte d'AGs insaturés sortent rapidement de cette zone, explorent le territoire environnant, puis reviennent éventuellement, avant la fin du test, sur la zone avec les AGs.

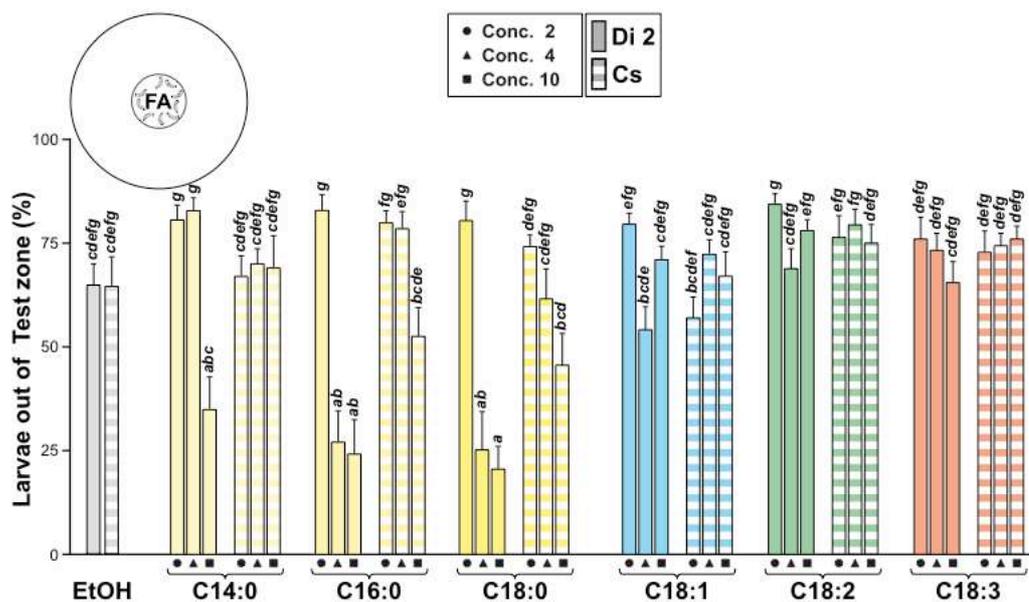


Figure R6 : Représentation de l'indice de répulsion en fonction de la lignée et des AGs testés. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(49df)=180,4 ; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

Pour étudier la dynamique de sortie des larves déposées sur la zone de l'AG, nous avons noté leur sortie de la zone de test toutes les 30 secondes (figure R7). Pour les concentrations

élevées d'AGs saturés (conc.10 pour le C14:0 ; conc 4 et conc 10 pour le C16:0 et le C18:0), les larves sortent lentement de la zone avec l'AG. Cela pourrait s'expliquer par le phénomène d'agrégation de « boule ». En effet, les larves qui se désolidarisent de cette boule y retournent de nouveau dès qu'elles se trouvent en contact avec cet AG. Donc si la boule reste compacte, ceci signifie que la totalité, ou la quasi-totalité des larves reste sur l'AG jusqu'à la fin du test, en maintenant cette forme d'agrégation.

En ce qui concerne les AGs insaturés, les larves en sortent librement et rapidement (en général avant 2 minutes). Le fait que les larves reviennent occasionnellement visiter cet AG explique que les 10 larves se trouvent rarement simultanément en dehors de la zone avec l'AG. Nous n'avons jamais observé de boule en effectuant nos tests sur les AGs insaturés (soit plusieurs centaines de tests réalisés au cours de la thèse).

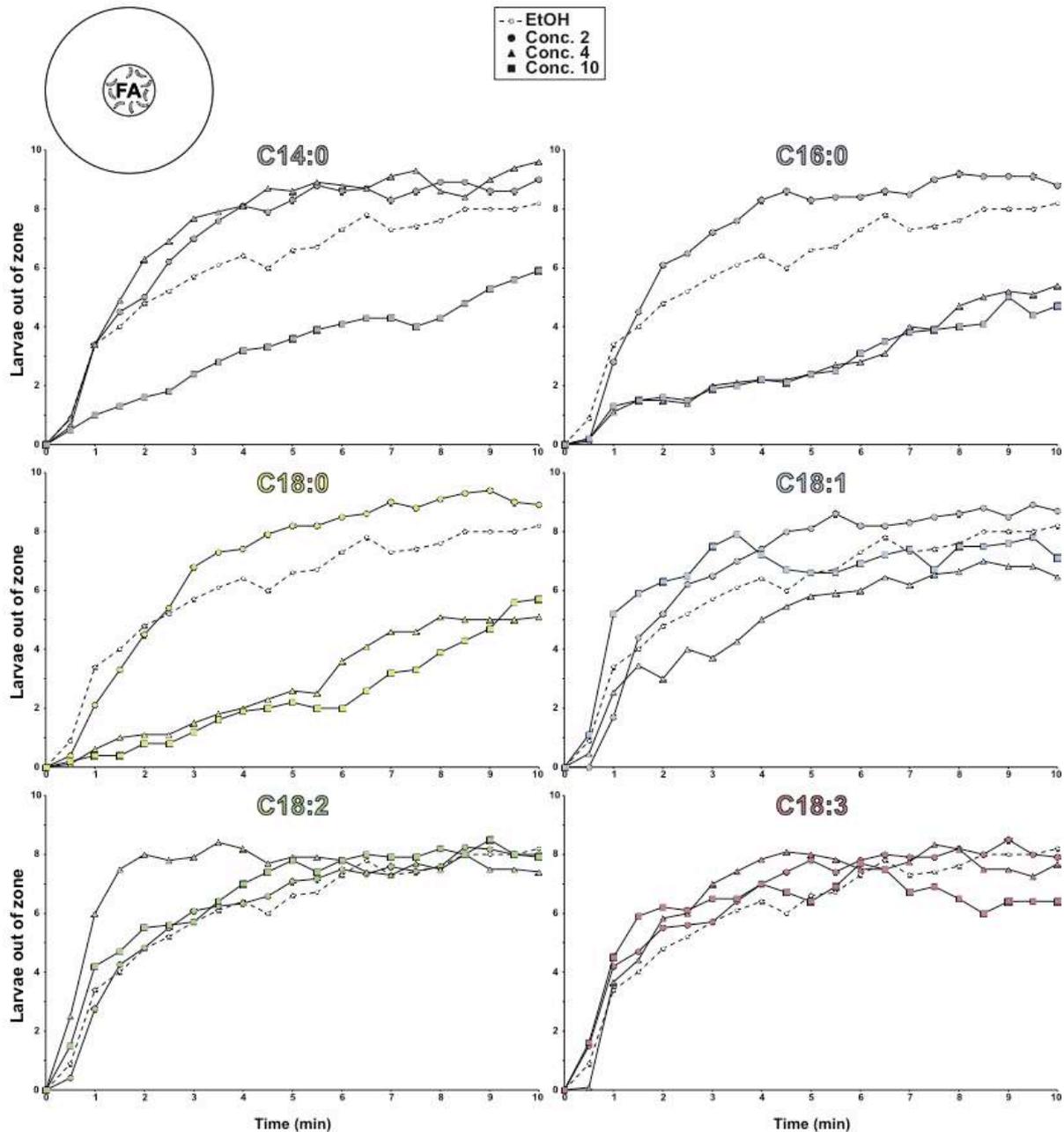


Figure R7 : Représentation du nombre de larves sortant de la zone de test en fonction du temps (min). Pour chaque test, n=10.

3.1.1.4 Indice de groupe

Puisque les larves déposées sur un AG saturé forment une boule, nous avons essayé de quantifier ce phénomène. Pour ce faire, on photographie les larves déposées directement sur des AGs, puis on comptabilise le nombre de larves impliquées dans les groupes et formant

des contacts interindividuels. On calcule un indice de groupe (IG ; Matériels et méthodes). Cet indice prend en compte le nombre de contacts et leur durée s'il implique au moins 3 larves.

La figure R8 montre les indices de groupe des larves Di2 sur différents AGs. Nous avons conservé les trois AGs saturés avec lesquels les larves montrent une réponse significative et 2 des trois AGs insaturés (C18:1 et C18:3).

Les larves déposées sur les AGs saturés montrent un IG élevé qui augmente avec la longueur de la chaîne carbonée (figure R8 ; figure A1 en annexe).

En ce qui concerne les AGs insaturés, étant donné le faible nombre de contacts induits par ces AGs, l'IG peu élevé est très proche de l'IG des témoins (larves déposées sur de l'éthanol).

Si on compare la durée des contacts établis par les larves (figure A1 en annexe) sur les différents AGs, on remarque qu'elle est brève pour les AGs insaturés, et plus durable avec les AGs saturés. Plus la longueur de la chaîne de l'AG saturé augmente, plus la durée des contacts augmente.

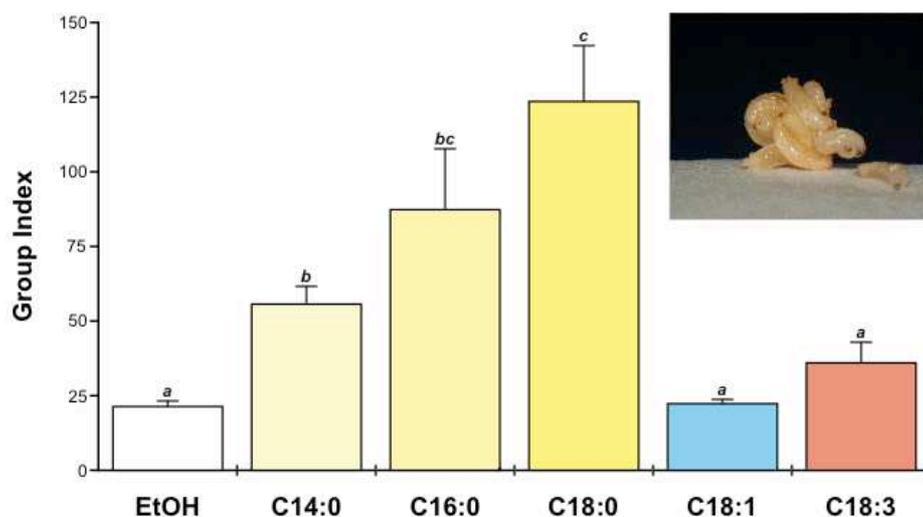


Figure R8 : Indice de groupe sur les Di2 avec les différents AGs testés (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(5df)=64,5 ; $p < 10^{-4}$). Pour test, n=10.

Cependant, un effet de groupe (lié à la présence des autres larves) étant possible, nous avons réalisé le même type de test mais en déposant une seule larve sur l'AG. Nous avons principalement mesuré le temps nécessaire à la larve pour sortir du spot (figure R9). Le profil

général est similaire à celui obtenu avec les groupes de larves, ce qui indique que l'effet de groupe a très peu d'effet sur la dynamique de sortie des larves hors du spot d'AG.

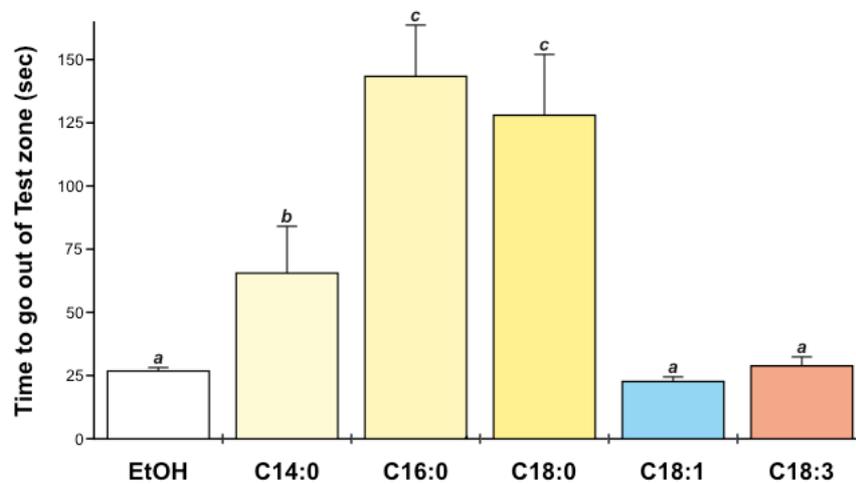


Figure R9 : Temps de sortie des larves (en sec). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. ($KW_5=56,5$; $p<10^{-4}$). Pour chaque test, $n=15$.

En conclusion, les larves sauvages montrent des réponses très différentes selon les AGs ; elles sont fortement repoussées par les AGs saturés et, parfois attirées à distance, par les AGs insaturés.

3.2 Etude des larves de lignées mutantes

Les comportements de larves de lignées témoins vis-à-vis de différents AGs étant déterminés, nous avons étudié le comportement de quelques lignées mutantes afin de déterminer si les gènes mutés pouvaient être impliqués dans la perception des AGs.

Nous avons d'abord testé une mutation dans le gène *desat1* qui code une $\Delta 9$ -désaturase, car cette enzyme est à la fois impliquée dans la perception et l'émission de phéromones (Marcillac et al. 2005a, Marcillac et al. 2005b) et aussi dans le métabolisme des AGs (Baker and Thummel 2007). Comme les phéromones sont des molécules structurellement très proches des AGs, il est possible que les drosophiles possédant la mutation *desat1* — et ayant des problèmes de perception de phéromones — pourraient également présenter des problèmes de perception des AGs. C'est pourquoi nous avons testé les drosophiles mutantes pour le gène *desat1*. Nous avons d'abord utilisé la souche 1573, qui

résulte de l'insertion d'un élément P-GawB (Gal4) dans la région promotrice du gène, puis utilisé des lignées construites au laboratoire par François Bousquet, et qui permettent d'altérer l'expression de *desat1* dans certains tissus par un système d'ARN interférent.

Nous avons également testé une lignée « mutante » pour la protéine CheB42a. En effet, cette protéine est également supposée être impliquée dans la perception des phéromones. Elle est exprimée dans les cellules accessoires de 10 soies gustatives des pattes T1 du mâle et permettrait la détection gustative des hydrocarbures cuticulaires potentiellement phéromonaux (Xu et al. 2002) (Park et al. 2006). Dans ce cas, nous avons utilisé la lignée transgénique CheB42a-Gal4 qui montrait des anomalies de discrimination des phéromones sexuelles (Svetec and Ferveur 2005).

3.2.1 Les larves mutantes *desat1*

3.2.1.1 Tests d'attraction avec 6 AGs

On teste les larves mutantes *desat1* sur les six AGs dosés aux 2 plus fortes concentrations (conc 4 et conc 10) grâce à un test d'attraction. La 3^{ème} concentration de 400µg/50µl (conc 8) a été uniquement testée avec le C14:0 qui montrait des résultats parfois difficiles à interpréter avec les 2 autres concentrations.

Les résultats obtenus par la lignée mutant *desat1-1573* (1573) lors des tests d'attraction ont été comparés à ceux obtenus avec la lignée témoin correspondante (N2) qui est une lignée obtenue par excision précise de l'élément P (et donc qui partage le même fond génétique que 1573 mais respectivement sans ou avec la mutation ; figure R10). La zone incluse entre les lignes pointillées représente la probabilité pour qu'une larve se trouve par hasard sur le spot indiqué en dessous des histogrammes.

D'abord, les larves N2 montrent un profil de réponse très similaire à celui obtenu avec la lignée témoin Di2 car elles sont significativement repoussées par les AGs saturés (sauf le C16:0) et significativement attirées par les AGs insaturés (aux 2 concentrations testées). La plus forte concentration (Conc.10) induit également les réponses les plus significatives, sauf dans le cas du C14:0, où c'est la plus faible concentration (Conc.4) qui induit les plus fortes réponses, et non la plus forte. C'est pourquoi nous avons testé une concentration intermédiaire (400µg/50µl ; conc 8) avec cette substance.

Si l'on compare la performance des lignées N2 et 1573, on note que les larves 1573 sont attirées par les AGs insaturés (Conc.10 pour C18:1 ; Conc. 4 et conc. 10 pour C18:2 ; Conc. 4 pour C18:3). En particulier, on observe que les larves 1573 sont repoussées par les fortes concentrations d'AG saturés puisqu'elles font demi-tour quand elles arrivent sur ces substances. Cependant, comme les résultats obtenus ne sont pas significatifs, nous avons mesuré les réponses des larves avec un test de répulsion, plus approprié pour observer ce comportement.

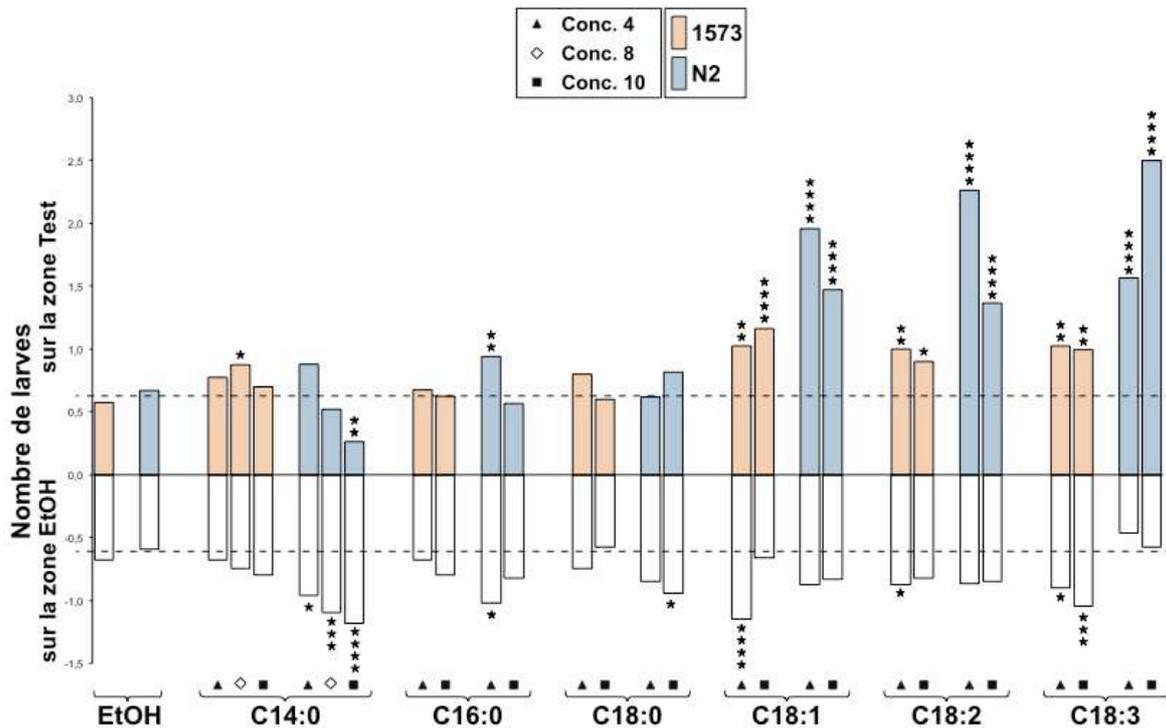


Figure R10: Représentation graphique des tests de discrimination effectués avec les larves desat1-N2 (restaurée pour desat1) et 1573 (mutante), en fonction des différents AGs dosés à différentes concentrations. La présence et le nombre d'étoiles indiquent une différence significative plus ou moins élevée avec le témoin ($Khi2(27df)=827 ; p<10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

3.2.1.2 Tests de répulsion avec 6 AG

Nous avons réalisé un test de répulsion avec six AGs. Les résultats sont présentés sur la figure R11.

Les tests témoins effectués avec de l'éthanol montrent que les larves sauvages N2 et les larves mutantes desat1 réagissent de la même façon vis-à-vis de l'éthanol. L'indice de répulsion est

élevé, les larves sortent rapidement de la zone test. En ce qui concerne les AGs saturés, les larves N2 réagissent comme les larves témoins Di2 puisqu'elles sont significativement repoussées par les C16:0 et C18:0 à conc 10. Lors des tests, le même phénomène de « boule » qu'avec les larves sauvages est observé avec ces deux AGs. Elles ont tendance à être repoussées par le C14:0 également mais les résultats obtenus ne sont pas significatifs. En revanche, les larves *desat1* ne semblent pas repoussées par ces AGs. En effet, elles montrent un indice de répulsion similaire que celui induit par l'éthanol.

Les larves N2 et 1573 réagissent de la même façon envers les AGs insaturés. L'indice de répulsion est ressemblant à celui induit par l'éthanol. Cela indique que les larves ne sont pas repoussées par ces AGs.

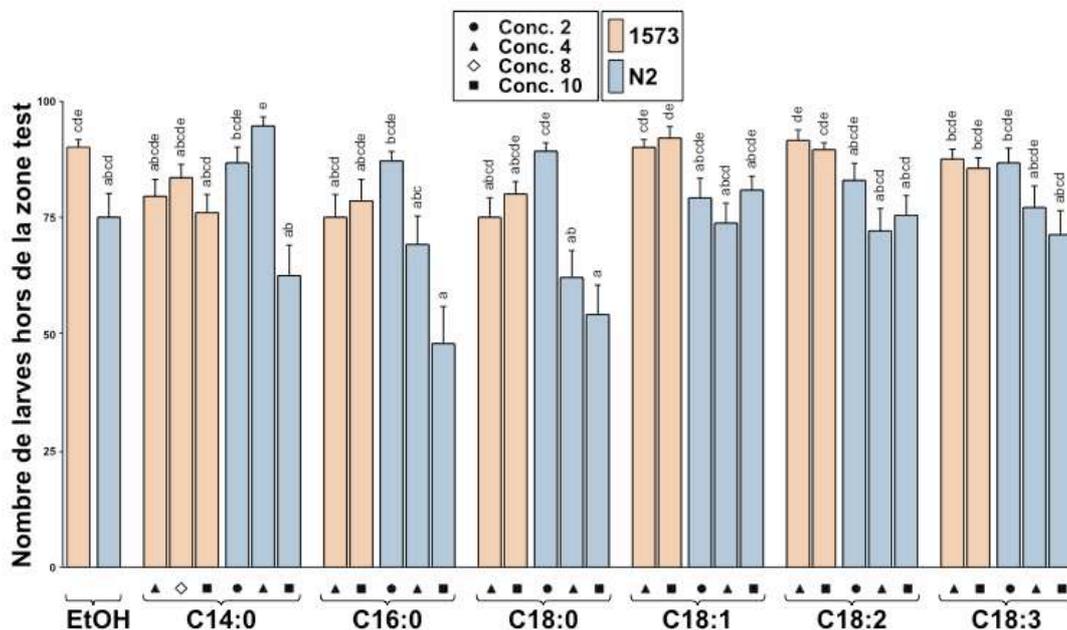


Figure R11 : Indice de répulsion des lignées N2 et 1573 en fonction des différents AGs testés. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(32df)=131 ; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

Les tests de répulsion effectués avec les larves 1573 montrent une tendance de ces larves (qui n'est pas significative) à être repoussées par les AGs saturés. C'est pourquoi, et afin de mieux déterminer le comportement des larves *desat1* vis-à-vis des AGs saturés, on a mesuré leur IG sur différents AGs. Comme les larves N2 réagissent de la même façon que les larves sauvages Di2, les résultats obtenus avec les mutants 1573 ont été comparés avec ceux précédemment

obtenus avec la lignée sauvage Di2, pour une raison pratique. En effet, il est plus facile d'obtenir rapidement un grand nombre de larves Di2 que de larves N2.

Les profils des IGs entre les larves Di2 et 1573 sont très différents (figure R12). Les larves Di2 forment des groupes sur les AGs saturés montrent un IG élevé, ce qui n'est pas le cas sur les AGs insaturés où l'IG est faible. Par contre, les larves 1573 montrent des IGs similaires pour tous les AGs testés ainsi qu'avec l'éthanol. Cependant, leur IG sur les AGs insaturés (en particulier sur le C18:1) est légèrement plus faible et proche de celui des larves témoins sur les mêmes AGs. Cette variation d'IG suggère donc que les larves 1573 ont un problème de perception des AGs saturés car elles semblent incapables de former une boule, donc des groupes sur ces substances normalement répulsives.

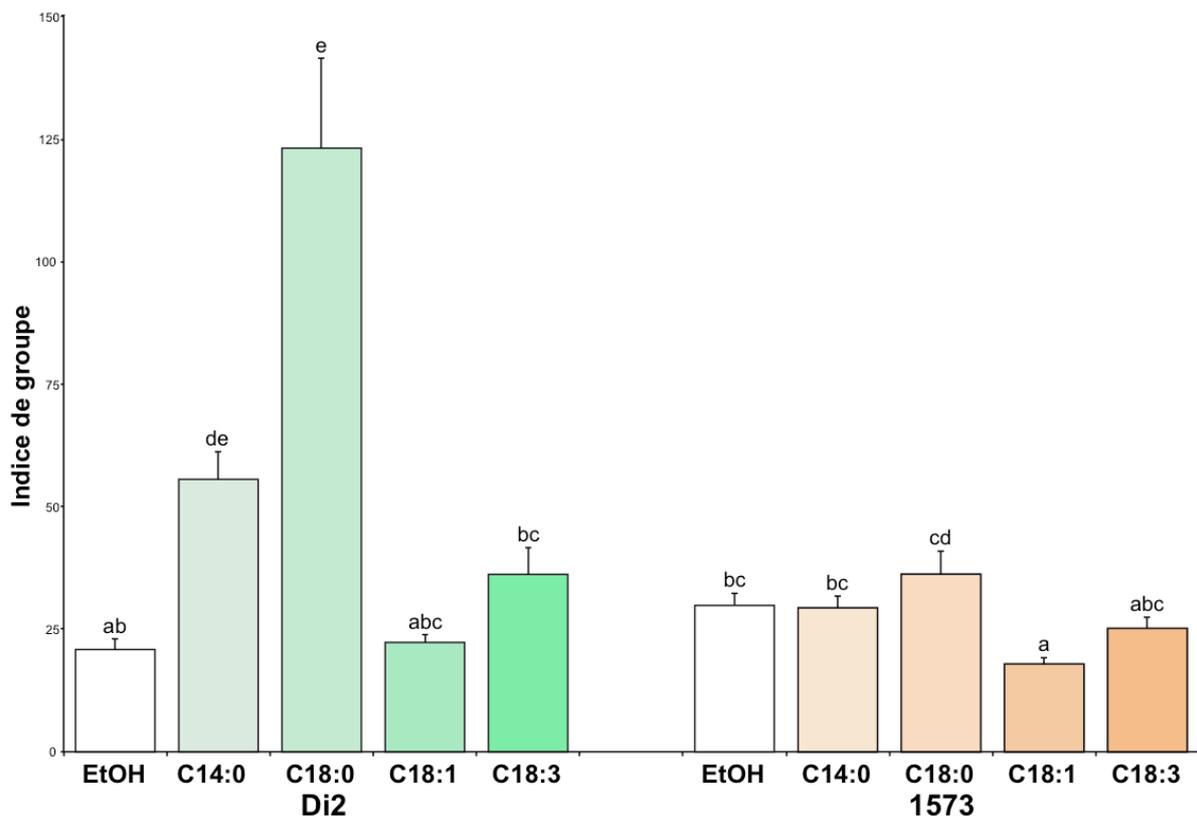


Figure R12 : Indice de groupe (IG) des larves Di2 et desat1, en fonction des AGs (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(9df)=93,67 ; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, n=10.

On regarde maintenant la durée maximale des contacts établis entre les larves mutantes pour le gène *desat1* pour les comparer avec ceux obtenus avec les larves Di2 (Figure R13). Les larves *desat1* montrent le même profil de « durée de contact » que les larves Di2 même si la différence pour cette durée est moins importante entre les AGs. Cet indice ne permet donc pas de différencier facilement les durées de contact selon l'AG et le génotype testé (figure R13 ; figure A2 en annexe).

Si les larves Di2 établissent un nombre important de contacts sur les AGs saturés, ce n'est pas le cas chez les larves 1573. Cependant, la durée maximale des contacts diffère beaucoup moins entre les 2 lignées, car elle est seulement un peu plus brève chez les larves 1573 quelque soit l'AG testé.

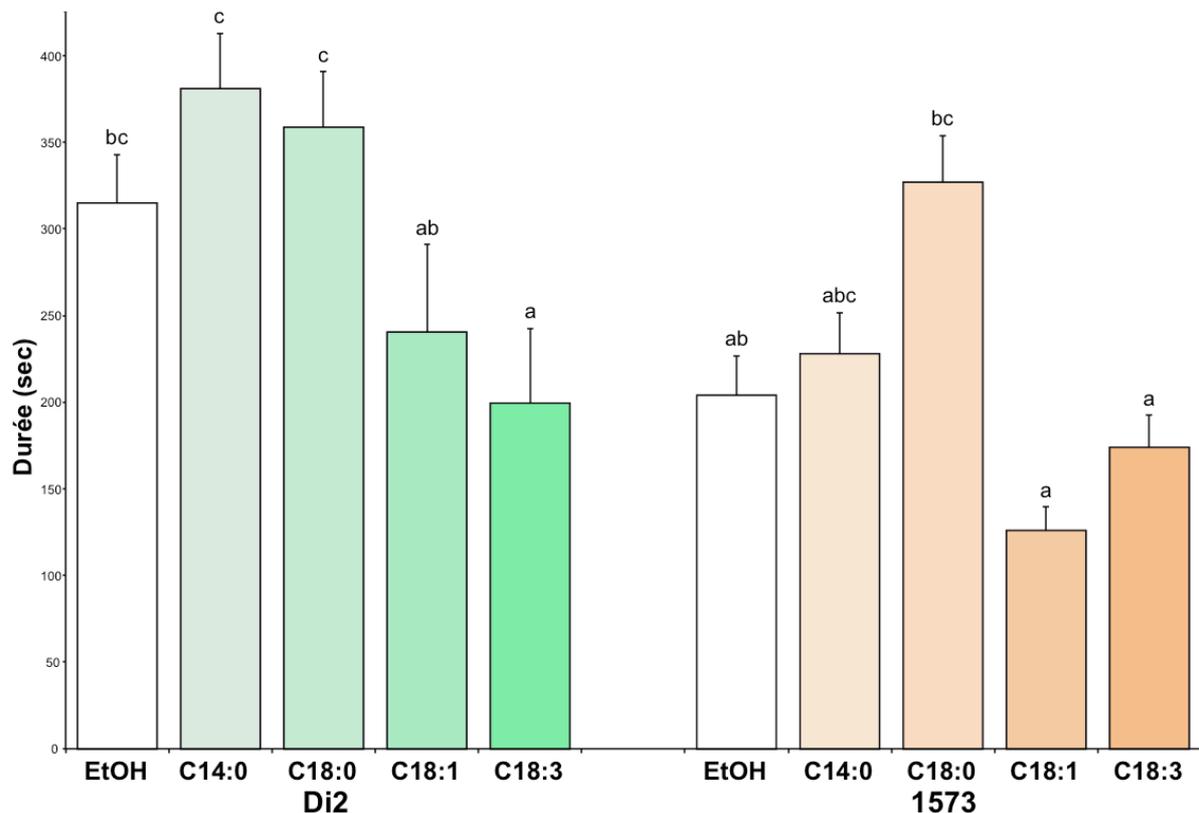


Figure R13 : Durée maximale des contacts chez les larves des lignées Di2 et 1573 en fonction des AGs (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW (9df)=62,53 ; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, n=10.

Si les larves mutantes reconnaissent donc bien les AGs saturés, elles ne forment pas de boule dessus. Comme ceci suggère que la mutation affecte les contacts entre larves, mais pas leur déplacement, nous avons mesuré leur activité locomotrice pour vérifier notre hypothèse. Comme les larves Di2 et 1573 ont la même activité locomotrice (figure R14), ce ne serait donc pas un problème de déplacement qui empêcherait les larves 1573 de former des groupes lorsqu'elles sont placées sur un AG saturé.

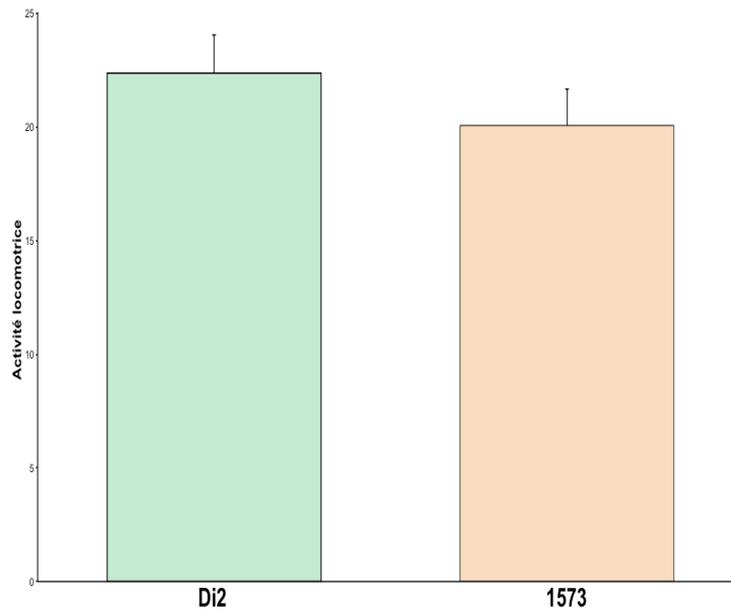


Figure R14 : Représentation graphique de l'activité locomotrice des larves Di2 et 1573. Il n'y a pas de différence significative entre génotypes : Mann-Whitney ($U(27,29)=448.00$; $p=0,3582$). Pour chaque génotype, $n=15$.

En résumé, nous avons démontré que les larves 1573 et les larves témoins (Di2/N2) avaient un comportement différent envers les AGs saturés. En particulier, les larves 1573 sont incapables de former des groupes lorsqu'elles sont sur ces AGs. Dans la partie suivante, nous avons testé différentes lignées transgéniques qui permettent de modifier l'expression du gène *desat1* uniquement dans des tissus bien ciblés afin de vérifier si la perturbation d'expression de ce gène dans un tissu précis pouvait induire de telles différences de comportement.

3.2.2 Les larves des lignées RA, RC, RE, RD et RDio possédant la séquence Gal4/UAS RNAi *desat1*.

3.2.2.1 Tests d'attraction avec 3 AGs

Afin de vérifier l'effet que pourrait engendrer la perturbation de *desat1* dans certains tissus de la larve, nous utilisons le système UAS-Gal4 qui nous permet de diminuer l'expression de ce gène dans un tissu précis.

Pour cibler l'expression de *desat1*, nous avons utilisé l'approche ARN interférent (RNAi) avec la lignée 33 338 (notée 33) qui est une lignée possédant une séquence UAS-RNAi *desat1*. Le RNAi dirigé contre l'ARNm de *desat1*, est piloté par un des 5 transgènes-pilote comprenant l'une des « régions régulatrice putative de *desat1* » fusionnée avec la séquence Gal4 (lignées notées RA, RC, RD, RDio et RE).

Tout d'abord, nous réalisons les tests d'attraction et de répulsion avec les larves témoins, possédant uniquement un des 5 transgènes RA, RC, RD, RDio et RE seuls (sans RNAi), afin de vérifier que ces transgènes pilotes n'induisent pas de changement de comportement des larves vis-à-vis des AGs. Nous effectuons également un test avec un 6^{ème} génotype témoin possédant uniquement le transgène UAS-RNAi *desat1*(33), et les génotypes expérimentaux combinant les 2 transgènes (notés RA/33, RC/33, RD/33, RDio/33 et RE/33).

Les résultats obtenus avec les différents témoins (possédant 1 transgène seulement) indiquent que ce transgène n'altère pas la réponse des larves envers les AGs (figure R15). Les tests avec l'éthanol montrent une répartition homogène des larves dans l'arène de test (sauf pour la lignée 33 qui semble légèrement attirée par l'éthanol). Les lignées témoins réagissent de façon identique aux larves sauvages puisqu'elles sont repoussées par le C18:0 et attirées par les AGs insaturés de façon significative.

Les larves RA/33 réagissent comme leurs témoins, avec néanmoins une plus grande répulsion vis-à-vis du C18:0 et une plus grande attraction envers les deux AGs insaturés. Cependant, comme le témoin éthanol induit une augmentation de l'attraction des larves, les résultats de RA/33 sont à interpréter avec précaution.

Les génotypes RC/33 et RE/33, montrent des réactions similaires aux larves témoins, avec cependant une plus grande répulsion vis-à-vis du C18:0 que par l'éthanol. Les larves de ces 2 génotypes sont significativement attirées par les AGs insaturés. Par contre, les larves RD/33 réagissent comme leur témoin car elles sont repoussées par le C18:0 et attirées par les AGs insaturés.

Les larves de la lignée RDio/33 réagissent comme leur témoin vis-à-vis des AGs insaturés ; elles sont attirées par ces AGs. Cependant il est important de noter qu'elles ne sont pas repoussées significativement par le C18:0, contrairement à leur témoin.

Les larves chez lesquelles l'expression de la protéine Desat1 est fortement diminuée dans le cerveau, le corps gras et les oenocytes (correspondant aux régions promotrices RA, RC et RE respectivement ; figure A3), réagissent de manière proche des larves sauvages avec cependant des variations qui restent à confirmer. Elles sont attirées par les AGs insaturés et repoussées par le C18:0. Elles réagissent également de la même façon que les larves 1573 vis-à-vis des AGs insaturés. Les larves dont l'expression de Desat1 est fortement diminuée et pilotée par la région promotrice RDio réagissent comme les larves 1573 ; elles sont attirées par les AGs insaturés et ne sont apparemment pas repoussées par le C18:0.

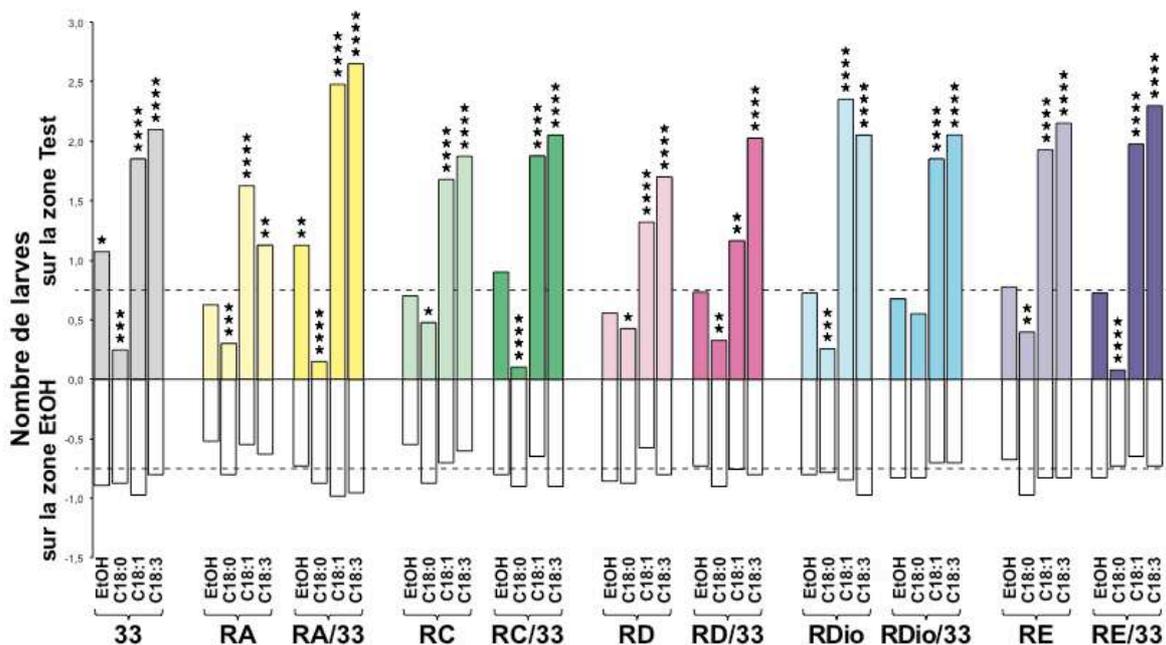


Figure R15 : Tests d'attraction réalisés avec les différents génotypes RA/33, RC/33, RD/33, RDio/33 et RE/33 et leurs témoins respectifs, en fonctions des différents AGs testés (conc 10). Les étoiles indiquent les niveaux de différence significative avec le témoin ($\text{Khi}2(44\text{df})=1877$; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

3.2.2.2 Tests de répulsion avec 3 AGs

Le test de répulsion est plus approprié pour observer la répulsion des larves (figure R16). Pour la lignée témoin ne possédant que le RNAi desat1 (33), l'indice de répulsion envers les AGs insaturés est le même que pour le témoin éthanol (comme pour les larves sauvages Di2). En revanche, quand ces larves sont placées sur le C18:0, elles montrent un indice de répulsion

significativement plus élevé que sur le témoin éthanol. Lors des tests, on observe que les larves sont repoussées par le C18:0, qu'elles ont du mal à sortir de la zone couverte avec cet AG et donc augmentent leur temps de sortie de la zone. Cependant, elles ne forment pas de groupe, d'où un indice plus élevé que sur l'éthanol.

Les larves RA/33 réagissent comme leur témoin, avec un indice de répulsion plus faible sur les AGs insaturés que sur l'éthanol et le C18:0. Elles ont le même profil de réponse que les larves 33 également.

Les larves RC/33 ont le même profil de réponse que leur témoin, un indice de répulsion plus faible sur les AGs insaturés que sur l'éthanol et le C18:0. Elles ont également le même profil de réponse que les larves 33. La perturbation de *Desat1* dans le corps gras n'induit donc pas de différence de réponse des larves envers les différents AGs testés.

Les larves RD/33 montrent le même profil de réponse que leur témoin RD ; un indice de répulsion un peu plus faible sur les AGs insaturés mais qui n'est pas significativement plus faible que sur l'éthanol ou le C18:0. La perturbation de *Desat1* dans le cerveau n'induit donc pas de changement de comportement des larves.

Les larves RDio/33 ont un profil de réponse similaire à leur témoin RDio avec un indice de répulsion élevé sur l'éthanol et le C18:0, et un indice de répulsion plus faible sur les AGs insaturés. La perturbation de *Desat1* dans le système nerveux central et périphérique n'induit donc pas de changement de comportement des larves.

Les larves RE/33 montrent un indice de répulsion similaire à leurs témoins sur l'éthanol. En revanche, les larves RE/33 placées sur le C18:0 montrent un indice de répulsion significativement diminué par rapport à leur témoin RE. En ce qui concerne les AGs insaturés, les larves RE/33 ont un indice de répulsion comparable à celui des témoins RE. Les larves RE/33 montrent donc un profil de réponse similaire aux larves 1573 (figure R11). La perturbation de *Desat1* dans les oenocytes induit un changement de comportement des larves par rapport aux larves sauvages. Il est donc intéressant de les tester individuellement ainsi que de tester l'indice de groupe de ces larves sur les AGs. On ne testera que les larves RE/33 et RC/33 (cette dernière servant de témoin puisqu'elle réagit de la même façon que ses témoins RC et 33).

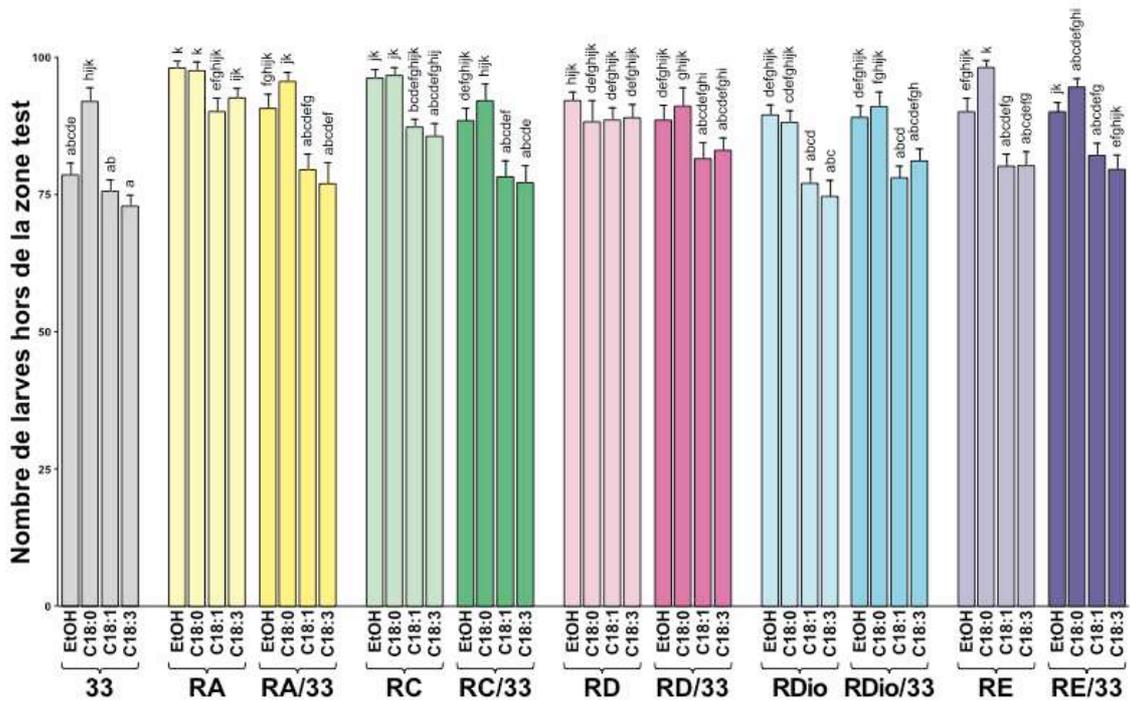


Figure R16 : Indice de répulsion des différentes lignées et leur témoin respectif, en fonction des différents AGs utilisés (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(43df)=243 $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

Les IGs des génotypes RC, RC/33, RE et RE/33 ont été calculés (figure R17). Sur l'éthanol et le C18:1, les IG des larves RC/33 et du témoin RC sont identiques. Sur le C18:0, l'IG des larves RC/33 n'est pas significativement plus élevé que celui de RC. Il n'y a donc pas d'effet sur l'IG des larves chez lesquelles *desat1* est perturbé dans le corps gras.

Les larves RE/33 et RC/33 montrent un profil de réponse similaire : leurs IGs sont identiques sur l'éthanol et le C18:1 à leurs témoins RE, et légèrement —mais pas significativement— plus élevé sur le C18:0 que leur témoin. Cependant, le nombre de contacts des larves RC/33 et RE/33 a tendance à être plus élevé que chez leurs témoins (respectivement, RC et RE).

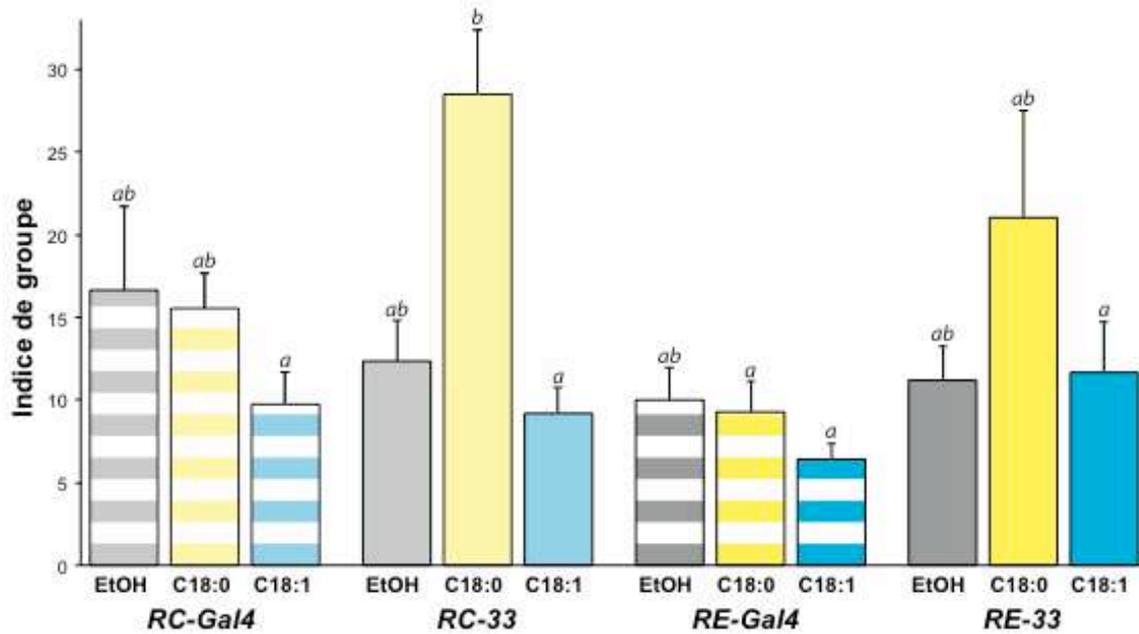


Figure R17: Indice de groupe des larves RC et RC/33 et des larves RE et RE/33 sur différents AGs (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(11df)=32,61 ; p=0,001). Pour l'éthanol, pour RC et RE n=11, pour les autres tests n =14-25.

La comparaison de la durée maximale pour les contacts établis entre les larves montre que les larves RC/33 restent plus longtemps sur le C18:0 que sur l'éthanol (figure R18). Cependant, le même phénomène chez leur témoin (RC). Il n'y a également pas de différence significative entre les larves RE/33 et RE. Les phénotypes obtenus semblent donc liés à l'expression de Gal4 dans les tissus où soit RC- soit RE-*desat1* s'exprime normalement et non pas à la perturbation ciblée de *Desat1* dans ces tissus. Ceci suggère que la perturbation de l'expression de *Desat1* dans le corps gras ou dans les oenocytes ne génère aucune différence de comportement des larves vis-à-vis des AGs (C18:0 et C18:1), si l'on considère séparément le nombre de contacts établis entre les larves et leur durée maximale.

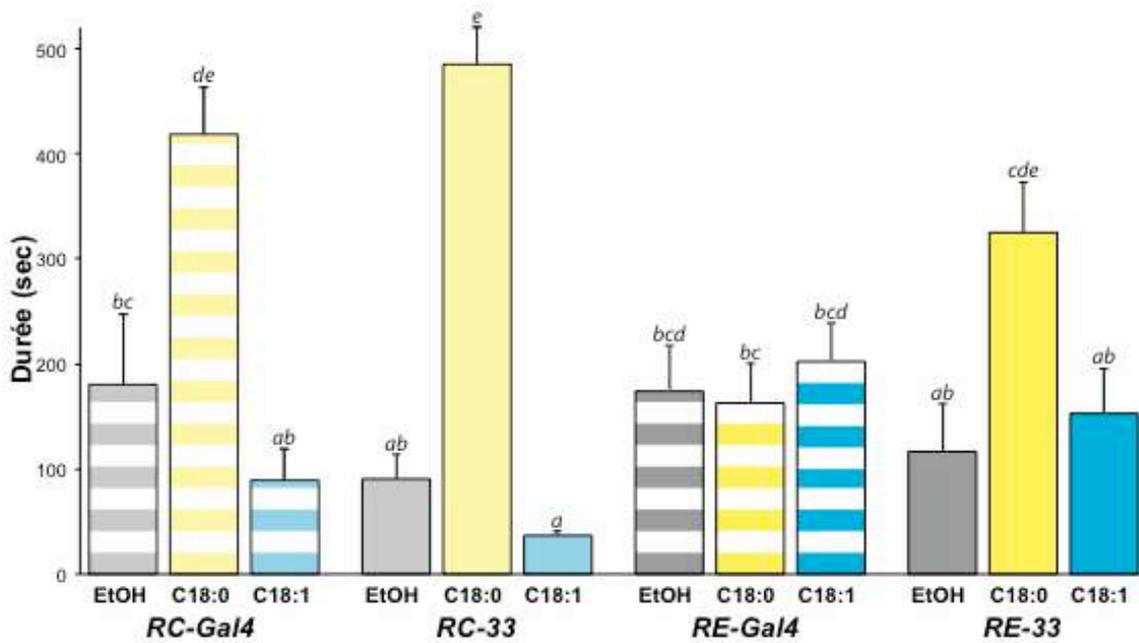


Figure R18 : Durée maximale des contacts établis entre les larves RC et RC/33 et les larves RE et RE/33 selon les différents AGs (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(11df)=98,82 ; $p < 10^{-4}$). Pour l'éthanol, pour RC et RE n=11, pour les autres tests n =14-25.

3.2.3 Larves Elav*33 338

3.2.3.1 Test d'attraction avec 3 AGs

Nous voulons vérifier l'effet général d'un pilote du système nerveux grâce à la protéine Elav qui est spécifique du système nerveux (Robinow and White 1988). Elav se lie à l'ARNm et aurait une fonction régulatrice. Elle est requise pour la différenciation du système nerveux ainsi que son maintien (Robinow and White 1991).

Utilisant le système UAS-Gal4, nous pouvons induire l'ARN interférent de *desat1* spécifiquement dans les neurones des larves de drosophiles dans le but de réduire très fortement le taux de transcription de *desat1* dans les neurones.

Nous avons tout d'abord vérifié le profil d'expression du pilote Elav-Gal4 correspondant à celui de la protéine Elav, en croisant la lignée Elav-Gal4 avec la lignée UAS-GFP.

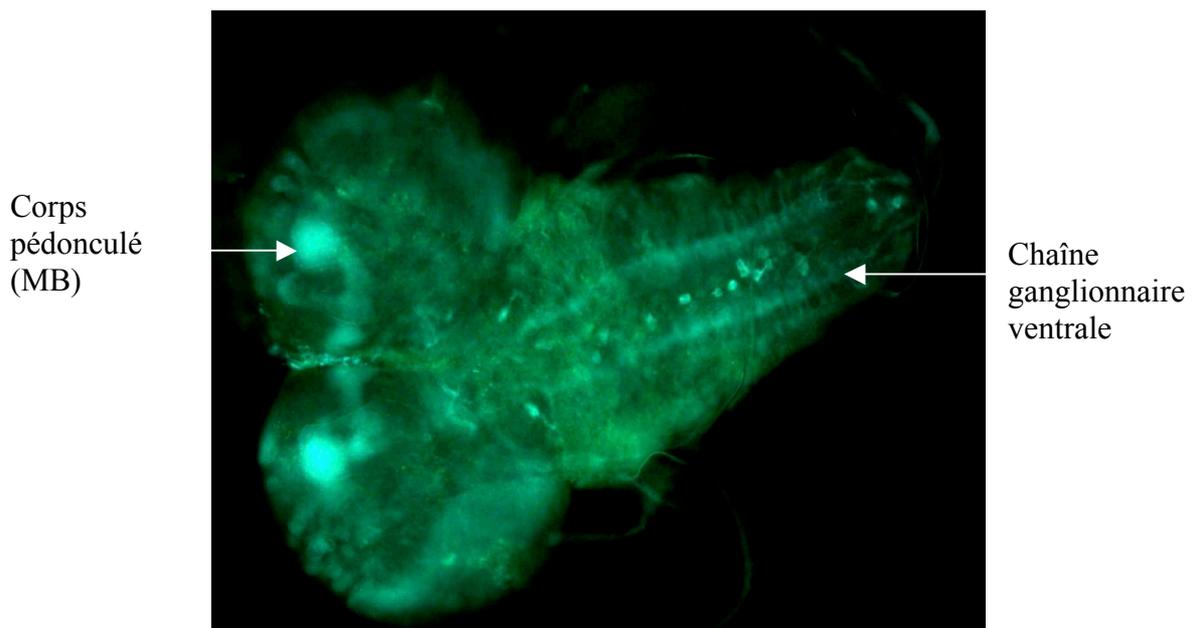


Photo 1 : Photographie de cerveau d'une larve possédant les 2 transgènes *Elav-Gal4* et *UAS-GFP* (microscope à fluorescence Leica DM 5000B ; caméra Leica DFC 300 FX).

On observe que la fluorescence provoquée par l'excitation de la GFP est présente dans le système nerveux central (photo 1) et périphérique des larves. Le transgène *Elav-Gal4* pilote donc bien la GFP dans le système nerveux.

Nous avons ensuite vérifié l'effet de chaque transgène parental sur le comportement des larves possédant seulement le transgène *Elav-Gal4* (noté *Elav*) ou le transgène *UAS-RNAi desat1* (noté 33), soit les 2 transgènes *Elav-Gal4* et *UAS-RNAi desat1* combinés (noté *Elav/33*). Les résultats obtenus pour les larves 33 ayant été décrits dans la partie 3.2.3, et montrant que ces larves réagissaient comme des larves témoins *Di2* (ce qui indique que le transgène *UAS-RNAi desat1* n'affecte pas la réponse des larves envers les AGs), ils ne seront pas décrits de nouveau dans cette partie.

Les tests d'attraction ont été effectués avec trois AGs (*C18:0* ; *C18:1* et *C18:3*) à la concentration la plus forte (conc 10 ; figure R19).

L'éthanol ne perturbe pas les larves *Elav* et *Elav/33* puisqu'elles se répartissent de façon homogène dans l'arène de test. Les larves témoins *Elav* sont significativement repoussées par le *C18:0*, et significativement attirées par les AGs insaturés. Elles réagissent donc bien comme des larves sauvages.

Les larves Elav/33 sont significativement attirées par les AGs insaturés, comme leur témoin. En revanche, elles sont moins fortement repoussées par le C18:0 que le témoin ($p < 0,001$), mais elles restent néanmoins significativement repoussées par cet AG ($p < 0,05$).

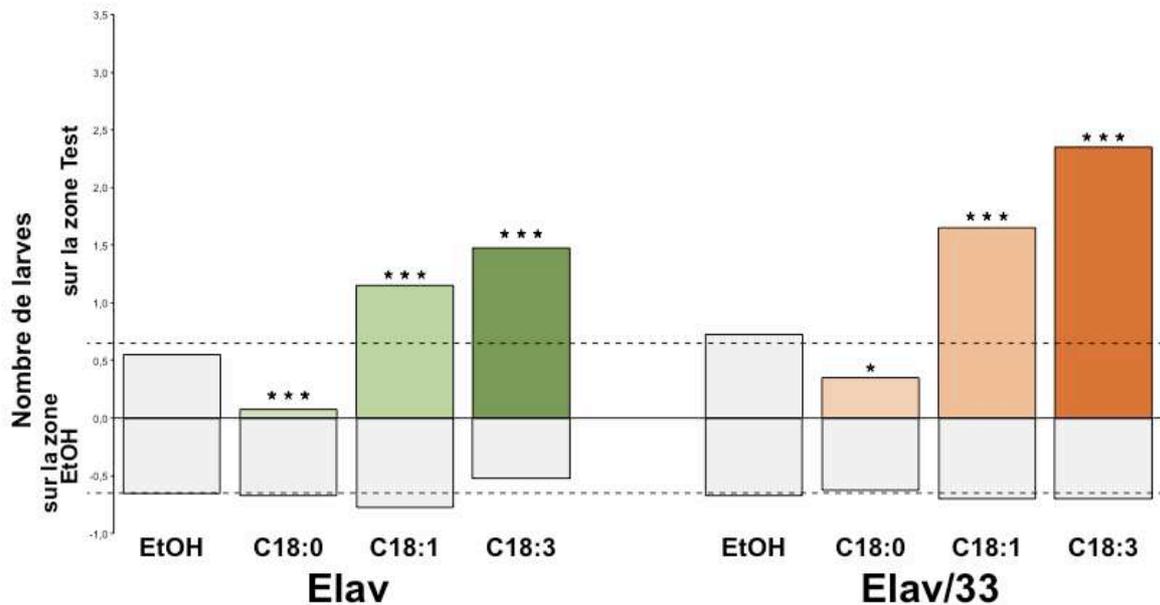


Figure R19 : Tests d'attraction réalisés avec les larves Elav et Elav/33, en fonction des différents AGs (conc 10). Les étoiles indiquent une différence significative avec le témoin ($Khi2(7df)=326$; $p < 10^{-4}$). Pour chaque AG et l'éthanol, $n=10$.

3.2.3.2 Tests de répulsion avec 3AGs

Les génotypes Elav et Elav/33 montrent des indices de répulsion similaires sur l'éthanol, le C18:0 et le C18:1 (figure R20). Les larves Elav et Elav/33 ne semblent donc pas repoussées par le C18:0. En revanche, le C18:3 induit un indice de répulsion significativement plus faible envers les larves Elav/33 qu'envers le témoin Elav. Comme les larves Elav/33 ne forment pas de groupe et qu'il a été démontré (auparavant grâce au test d'attraction) qu'elles étaient attirées par le C18:3, la différence observée avec l'éthanol suggère simplement que les larves Elav/33 mettent plus de temps à sortir de la zone avec cet AG que sur l'éthanol.

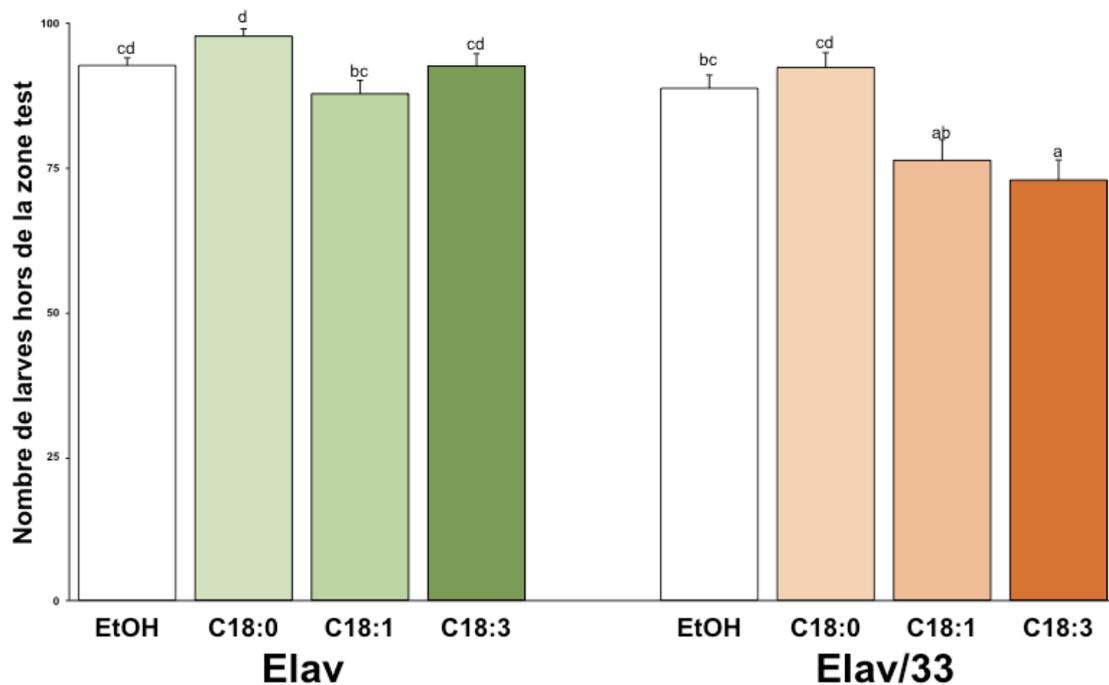


Figure R20 : Indice de répulsion des lignées Elav et Elav/33, en fonction des différents AGs testés (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (KW(7df)=43,5 ; $p < 10^{-4}$). Pour chaque test, $n=10$.

On ne peut donc pas conclure sur l'éventuel effet de la diminution du taux de protéine Desat1 dans les neurones des larves, puisque les larves Elav/33 réagissent comme leur témoin Elav vis-à-vis du C18:0 et du C18:1. En revanche, on observe que cette diminution n'affecte pas l'attraction des larves pour le C18:3.

3.2.4 Larves CheB42a

3.2.4.1 Tests d'attraction avec 4 AGs

La protéine CheB42a est soupçonnée d'être impliqués dans la perception des phéromones chez les adultes (Park et al. 2006). Nous avons donc testé les larves et les adultes portant le transgène CheB42a-Gal4 qui perturbe la discrimination de ces phéromones (Svetec and Ferveur 2005). On a effectué des tests d'attraction avec les larves homozygotes pour le transgène B42-Gal4 face à quatre AGs. Les données ont été comparées à celles obtenues

précédemment avec les larves Di2. Nous avons aussi testé cette lignée transgénique avec une concentration d'AG plus faible (conc 0,2, représentée par un cercle vide sur la figure R21).

Le profil des réponses des larves transgéniques CheB42a envers les AGs est globalement similaire à celui des larves témoins Di2 (figure R1). L'éthanol ne perturbe pas le comportement des larves puisqu'elles se répartissent de façon homogène sur les tests témoins (éthanol vs éthanol) et elles sont attirées par les AGs insaturés de façon significative. Cependant, dans 3 des 4 tests impliquant les AGs saturés, la réponse envers l'éthanol est réduite par rapport aux larves Di2.

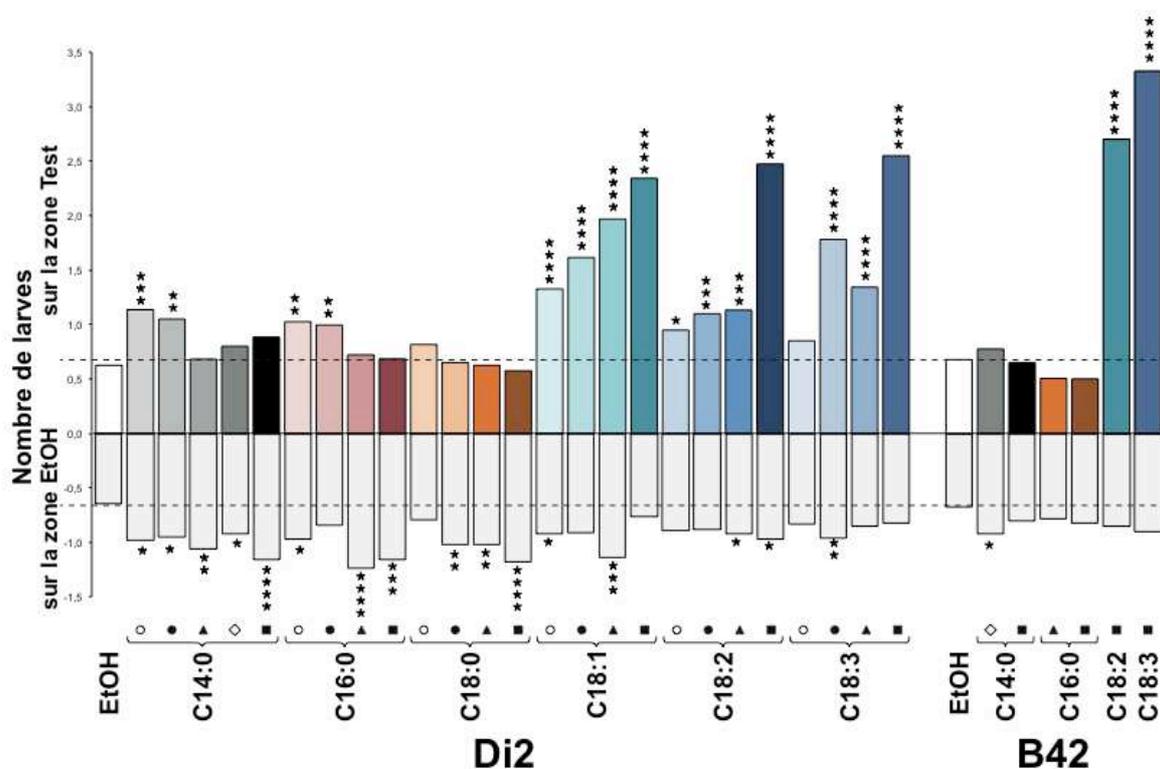


Figure R21 : Tests d'attraction effectués avec les larves CheB42a, en fonction des différents AGs. Pour chaque test, n=10.

3.2.4.2 Test de répulsion avec 4 AGs

On effectue également un test de répulsion afin de vérifier l'effet des AGs saturés sur cette lignée. Cela permet également de vérifier si les larves sont capables de former une boule sur le C18:0 comme les Di2. L'indice de répulsion (figure R22) nous permet de mettre en

évidence une réaction d'évitement des larves vis-à-vis des AGs saturés (à peu près égal à celui noté pour les AGs insaturés) par rapport à l'indice de réponse vis-à-vis de l'éthanol. Ces résultats contredisent partiellement ceux réalisés sur l'attraction des larves (figure R21), puisqu'ils suggèrent que les larves B42-Gal4 sortent plus lentement de la zone d'AG insaturé que sur l'éthanol. Ces tests suggèrent aussi que le transgène B42-Gal4 interviendrait dans la réponse répulsive envers les AGs, peut-être en interaction avec la réponse perturbée envers l'éthanol, car les larves B42-Gal4 sortent aussi beaucoup plus lentement que les larves Di2 de la zone avec l'éthanol.

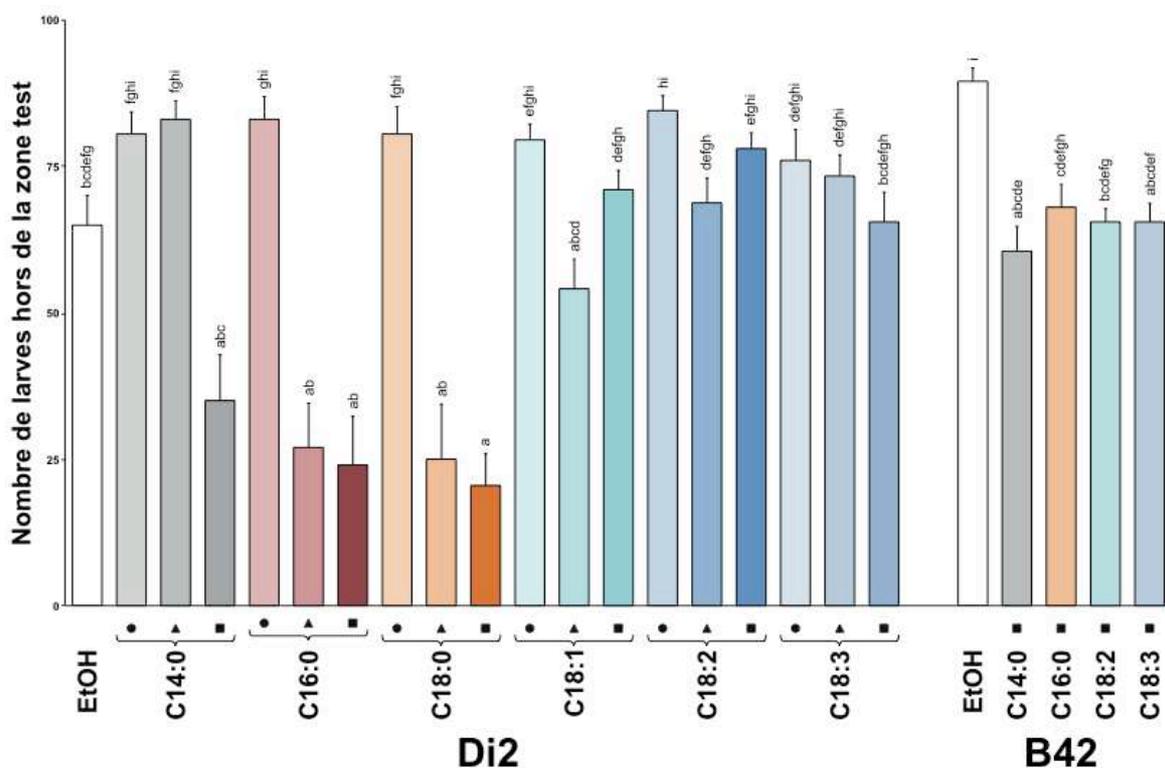


Figure R22 : Indice de répulsion des larves CheB42a, en fonction des différents AGs testés (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. Pour chaque test, n=10.

Les larves B42-Gal4 ont donc un comportement globalement proche de celui des larves sauvages ; elles sont attirées par les AGs insaturés et repoussées par les AGs saturés, mais les performances des larves transgéniques montrent quand même quelques différences.

On testera plus loin les adultes B42-Gal4 en utilisant le test de PER (voir partie 3.5.2.3).

3.3 Etude de larves témoins élevées sur un milieu carencé en AGs (purée de pomme de terre)

3.3.1 Tests d'attraction avec 2 AGs

Nous avons montré que les larves issues de lignées témoins élevées sur un milieu riche en AGs étaient capables de discriminer les AGs. Pour voir si des larves élevées sur un milieu carencé en AGs montraient des réponses différentes, nous avons élevé la lignée sauvage Di2, pendant environ 50 générations, sur un milieu appauvri en AGs consistant uniquement en purée de pomme de terre lyophilisée de premier prix.

Les réponses des larves élevées sur un milieu carencé en AGs ont été mesurées envers la plus forte concentration (conc 10) de C18:0 et C18:3, qui induisaient les réponses les plus contrastées chez des larves élevées sur un milieu témoin. La probabilité expérimentale de retrouver aléatoirement des larves dans les zones d'intérêt, calculée grâce à des tests témoins réalisés avec deux zones d'éthanol est 7,4% (soit avec 10 larves testées, la probabilité aléatoire est de 0,74 larve). Elle est représentée ici par les lignes pointillées situées de part et d'autre de la ligne de base.

Avec les larves provenant d'un milieu témoin (larves témoins), les tests témoins montrent une répartition homogène des larves sur les 2 spots d'éthanol ce qui indique que cette substance n'a pas d'effet visible sur le comportement des larves. Les larves témoins réagissent de façon identique aux tests effectués précédemment, c'est à dire qu'elles sont significativement repoussées par le C18:0 et attirées par le C18:3. Lorsque l'on dépose simultanément ces deux AGs sur le papier filtre, les larves vont préférentiellement sur la zone du C18:3 que sur celle du C18:0.

Les larves provenant d'un milieu carencé en AGs (notées larves carencées), montrent des performances globalement similaires avec quelques différences de significativité. Tout d'abord, les tests témoins induisent la répartition homogène des larves sur les 2 spots d'éthanol qui n'a donc pas d'effet sur le comportement des larves. Les tests réalisés avec le C18:0 induisent une légère augmentation du nombre de larves sur la zone d'éthanol par rapport à normale alors qu'elles sont fortement repoussées par le C18:0. Si les larves carencées ont un comportement similaire aux larves témoins, elles semblent cependant réagir

plus lentement face au C18:0. En effet, lors des tests, elles restent quelques secondes sur la zone d'AG avant d'exprimer leur aversion, ce qui n'est pas le cas des larves témoins qui réagissent plus rapidement. Les larves carencées sont significativement attirées par le C18:3 mais de manière moins forte que les larves témoins.

Les tests combinant le C18:0 et le C18:3 montrent les mêmes variations de réponses entre les larves témoins et carencées. Si dans les deux cas, les larves sont significativement plus nombreuses sur l'AG insaturé que sur l'AG saturé, comme pour le test précédent, les larves carencées montrent des réponses moins contrastées que les larves témoins. Ceci confirme les résultats ci-dessus : si les larves provenant d'un milieu carencé sont encore attirées par le C18:3 et légèrement repoussées par le C18:0, leur discrimination semble réduite par rapport aux larves témoins (figure R23).

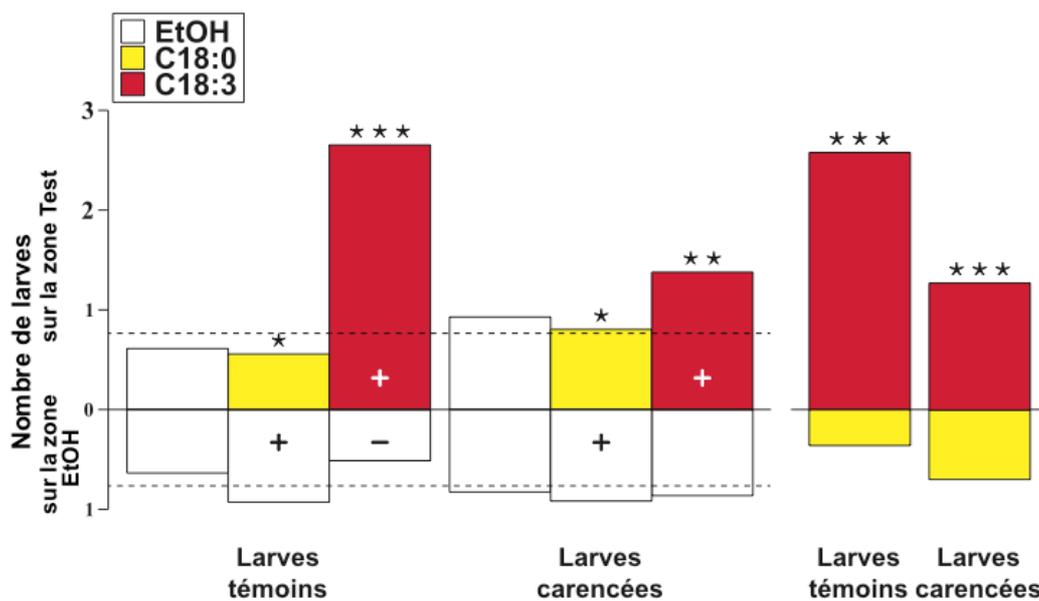


Figure R23 : Tests d'attraction réalisés avec les larves témoins et carencées, sur différents AGs (conc 10). Les étoiles représentent les différents niveaux de significativité. Les signes « + » et « - » indiquent une activité générale supérieure ou inférieure à la valeur de probabilité expérimentale. Pour les tests EtOH vs AG $\text{Khi2}(10\text{df})=550,9$; $p < 10^{-4}$, pour les tests AG vs AG $\text{Khi2}(3\text{df})=49,0$; $p < 10^{-4}$. Pour chaque AG, $n=20$, pour l'éthanol $n=12$.

3.3.2 Comportement individuel des larves carencées

Puisque les larves élevées sur un milieu carencé en AGs semblent moins bien reconnaître les AGs, elles pourraient avoir des problèmes pour percevoir ceux-ci. Nous avons ainsi mesuré, à partir de tests réalisés avec des larves individuelles, des paramètres plus précis du comportement des larves face au C18:0 et au C18:3, en notant leur premier choix, le temps passé sur chaque AG et leur activité locomotrice relative. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus simultanément avec les larves sauvages Di2 élevées sur un milieu témoin.

On regarde d'abord le premier choix effectué par les larves dans l'arène de test (figure R24). Quand nous mesurons le premier choix effectué par les larves témoins dans l'arène de test, les tests témoins (éthanol vs éthanol) induisent des réponses aléatoires (environ 45% sur une zone et 55% sur l'autre zone) ce qui indique que l'éthanol n'a pas d'effet sur le comportement des larves.

Les tests réalisés en présence de C18:0 ou de C18:3 montrent que les larves vont se diriger directement sur celui-ci.

En comparaison, si les larves carencées, se répartissent également de façon aléatoire dans les tests témoins avec l'éthanol (59% vs 41%), elles se répartissent aussi de façon aléatoire sur le C18:0 ou le C18:3 (environ 50% sur l'éthanol et 50% sur l'AG pour le premier et le second choix).

Ceci renforce bien le résultat obtenu précédemment (figure R25) où les larves provenant d'un milieu carencé en AGs montraient une discrimination réduite lorsqu'elles se trouvaient en présence de C18:0 ou de C18:3.

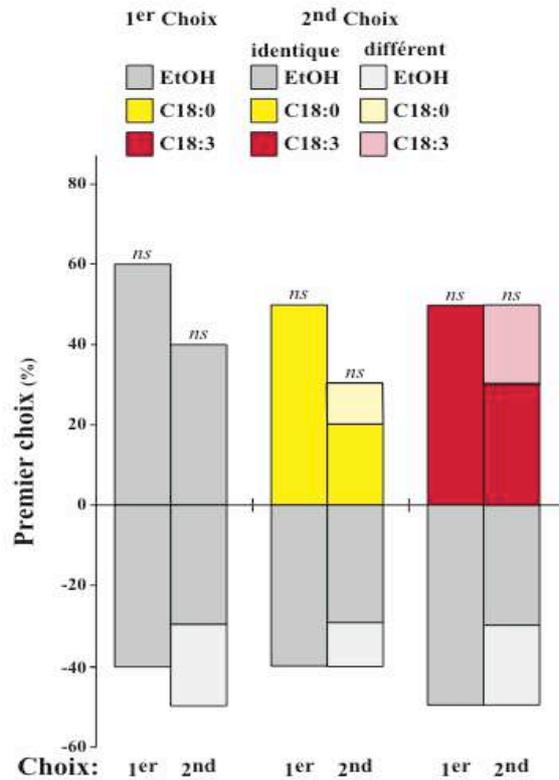


Figure R24: Premier et second choix (%) des larves dans l'arène de test. Pour les tests avec les larves carencées (test exact de Fisher) $p=0,04$. $n=10$.

La mesure du temps passé dans chaque zone montre que les larves témoins passent un temps similaire sur les 2 zones d'éthanol, qui ne change donc pas leur comportement (figure R25).

Les larves témoins passent plus de temps sur le C18:0 que sur l'éthanol. Les larves témoins passent aussi beaucoup plus de temps sur le C18:3 (environ 22 % du temps) que sur l'éthanol : elles montrent donc une tendance à rester sur la zone contenant du C18:3. Ces résultats suggèrent que les larves sont stimulées par la présence d'un AG.

Si les larves carencées montrent des performances similaires à celles obtenues par les larves témoins, elles passent 17% du temps en moins sur le C18:3 que les larves témoins.

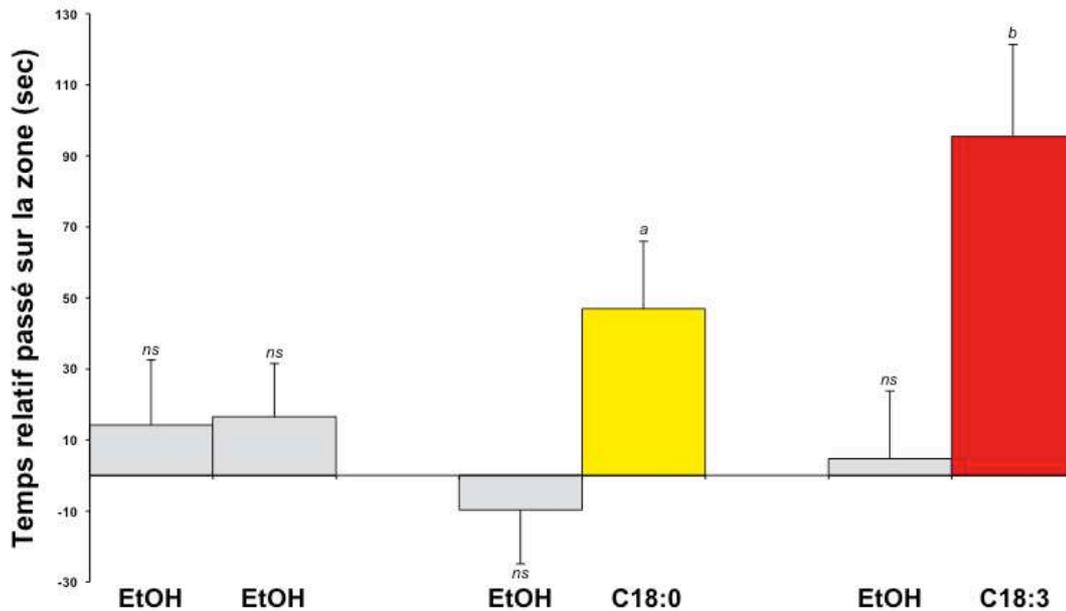


Figure R25 : Temps relatif (en sec) passé par les larves dans les cercles d'intérêt. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. KW(7df)=17,27 ; p=0,016, ns = pas de différence avec le témoin. n=10.

L'éthanol n'a pas d'effet sur l'ALR (Activité Locomotrice Relative) des larves témoins (figure R26). En effet, l'ALR des larves témoins reste faible et varie peu dans le temps (ALR de référence). En présence de C18:0, l'ALR des larves augmente par rapport à l'ALR de référence, ce qui suggère que les larves sont stimulées par la présence d'AG. Il est possible qu'elles explorent beaucoup plus l'arène de test afin de localiser cet AG. En présence de C18:3, l'ALR des larves diminue fortement par rapport à l'ALR de référence : ici les larves ont tendance à rester sur la zone où se trouve cet AG ce qui expliquerait la faible activité locomotrice.

En présence d'éthanol, les larves carencées, montrent un faible ALR qui varie légèrement dans le temps (ALR de référence). En présence des deux AGs testés, l'ALR des larves est perturbée car après un début d'augmentation, elle diminue avec le temps. C'est surtout sur le C18:3 que les défauts d'ALR des larves carencées sont nets. Elles montrent seulement une légère augmentation de leur ALR alors que les larves témoins montraient une forte diminution d'ALR. Ceci renforce l'hypothèse que les larves carencées ont une réponse perturbée envers le C18:3.

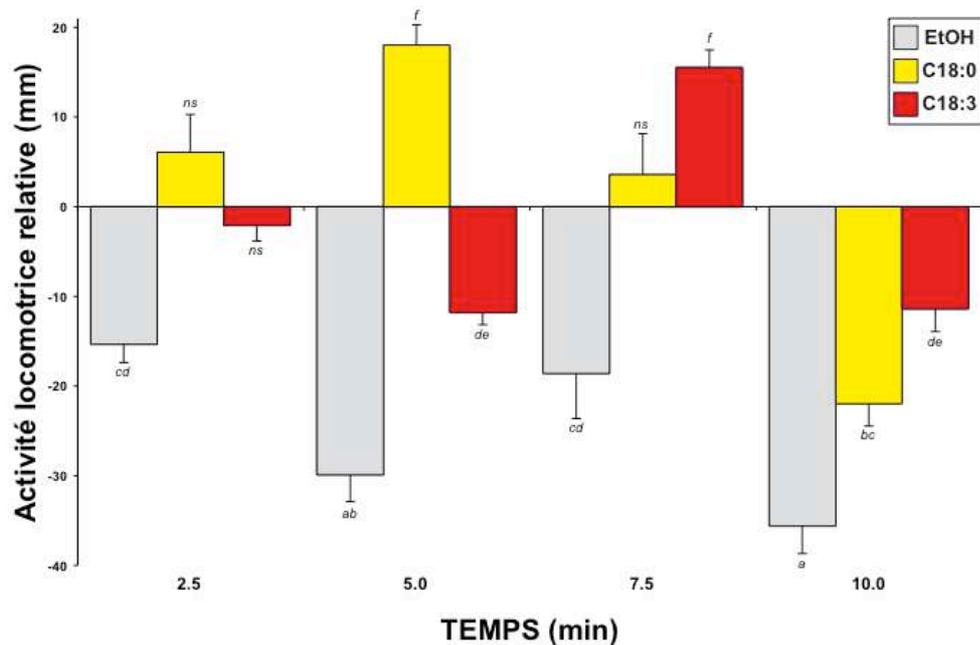


Figure R26: Activité locomotrice relative (mm) des larves. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives (ns = non significatif). KW(15df)=97,58 ; $p < 10^{-4}$. n=10.

Comme la composition en AGs des larves peut changer selon le milieu sur lequel elles sont élevées (Geer and Perille 1977, Stark et al. 1993), nous avons effectué une chromatographie en phase gazeuse afin de connaître et comparer la composition en AGs libres du corps gras des larves élevées sur 2 types de milieux, pour vérifier s'il existait un lien (même indirect) entre la composition en AGs et la perturbation de la réponse envers le C18:3. Aucune différence de profil chromatographique n'est mise en évidence entre les larves élevées sur milieu témoin et les larves élevées sur milieu carencé en AGs (notées larves carencées par la suite). Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté sur la figure R27. (Résultats obtenus par J-P Farine, communication personnelle).

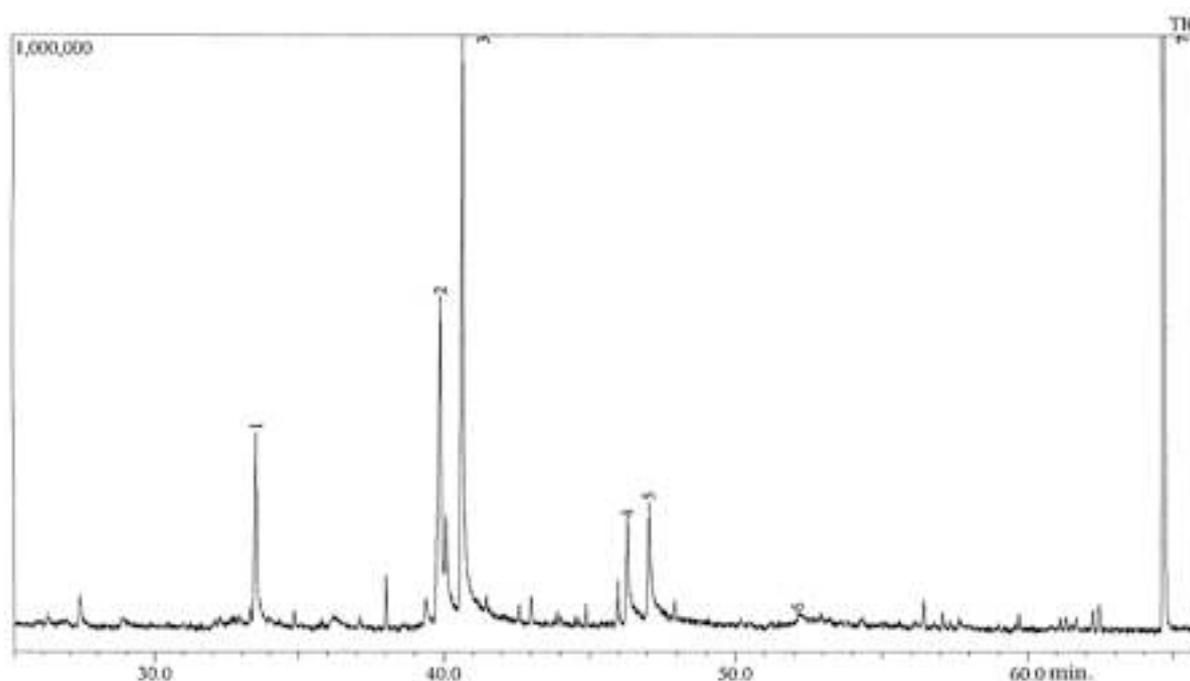


Figure R27: Exemple de chromatogramme obtenu après extraction des acides gras libres d'une larve de troisième stade de *D. melanogaster* (lignée Di2).

Pic 1, C12:0; *pic 2*, mélange de C14:3, C14:2, C14:1; *pic 3*, C14:0; *pic 4*, C16:1; *pic 5*, C16:0; *pic 6*: mélange de C18:3, C18:2, C18:1; *pic 7*, standard interne (C26).

Les résultats quantitatifs obtenus sont résumés dans le tableau TR1. Les acides en C14 (pics 2 et 3) sont largement majoritaires et représentent environ 70% de la totalité des AGs extraits, alors que les acides en C18 sont minoritaires (environ 2% de la totalité des acides extraits).

	Larves témoins	Larves carencées en AGs
Pic 1	29 ± 4	41 ± 7
Pic 2	131 ± 25	98 ± 12
Pic 3	174 ± 19	166 ± 17
Pic 4	20 ± 3	29 ± 6
Pic 5	38 ± 8	40 ± 6
Pic 6	8 ± 2	8 ± 1

Valeurs : ng ± SEM

Tableau TR1 : Quantités d'AGs libres (ng) détectées chez les larves.

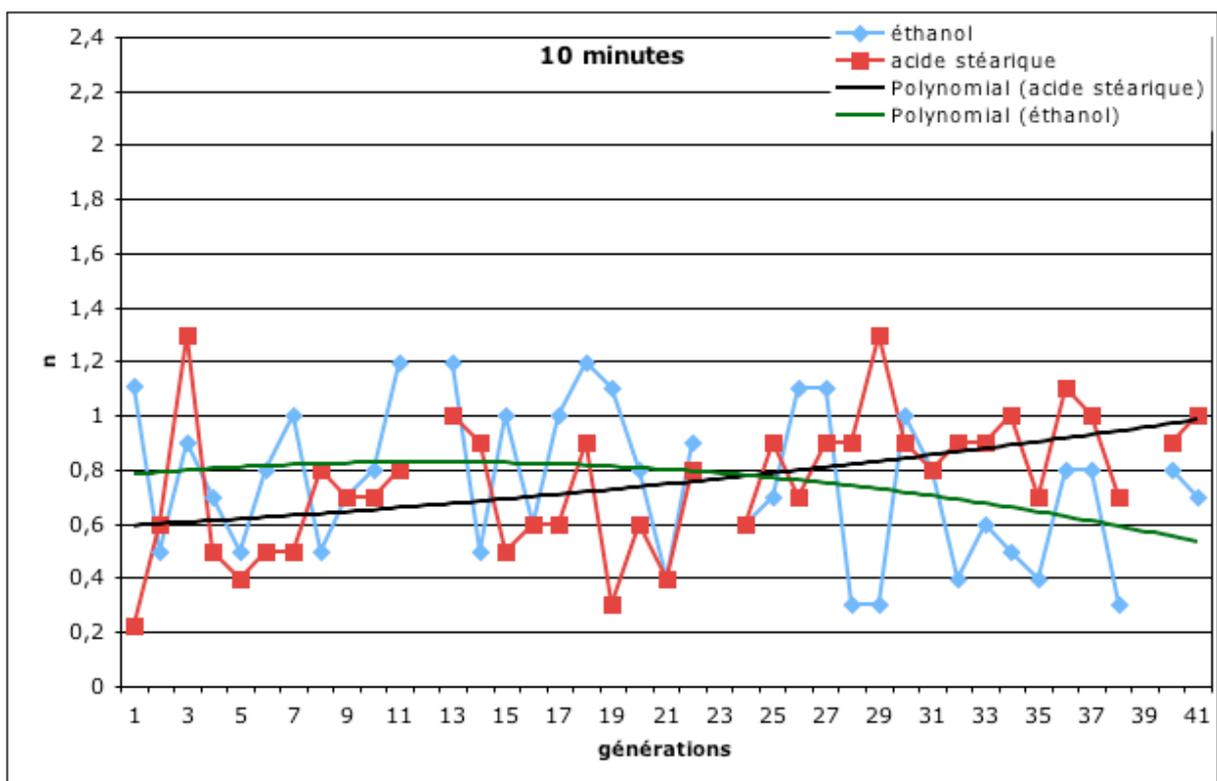
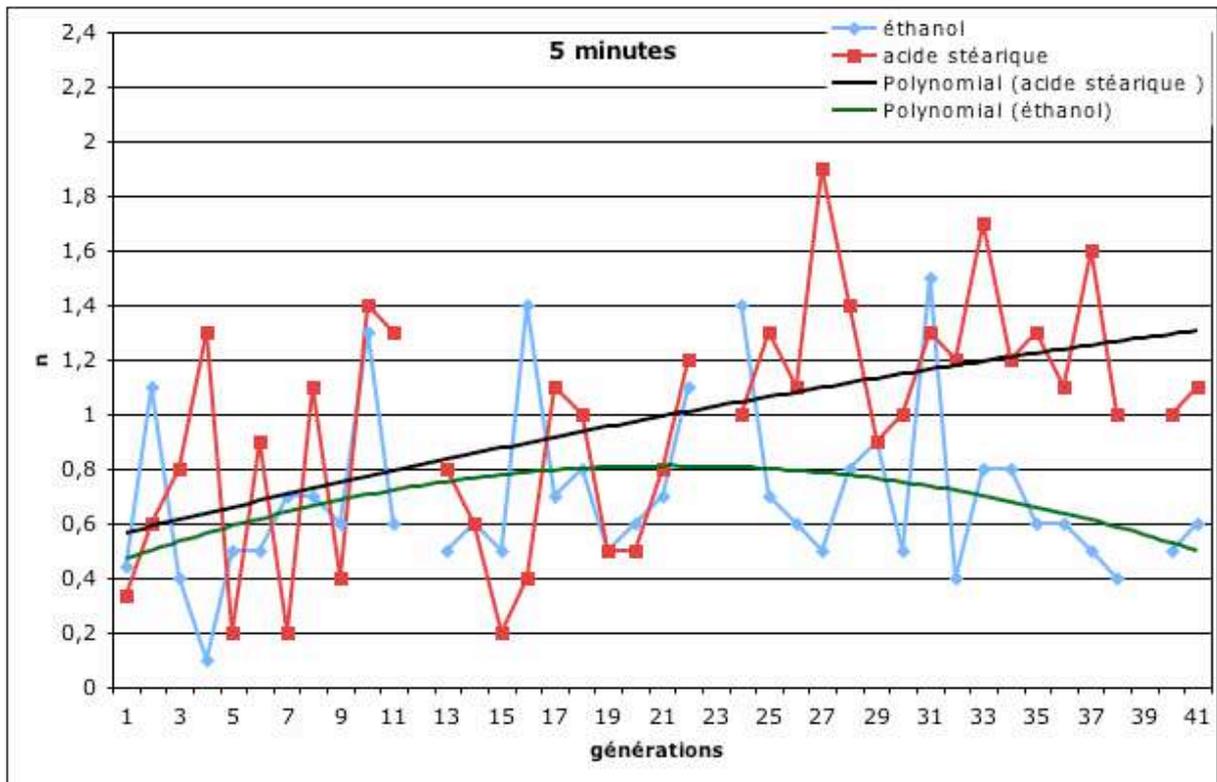
L'analyse statistique effectuée (test U de Mann et Whitney) ne montre aucune différence significative entre les différents AGs extraits chez les larves élevées sur les 2 types de

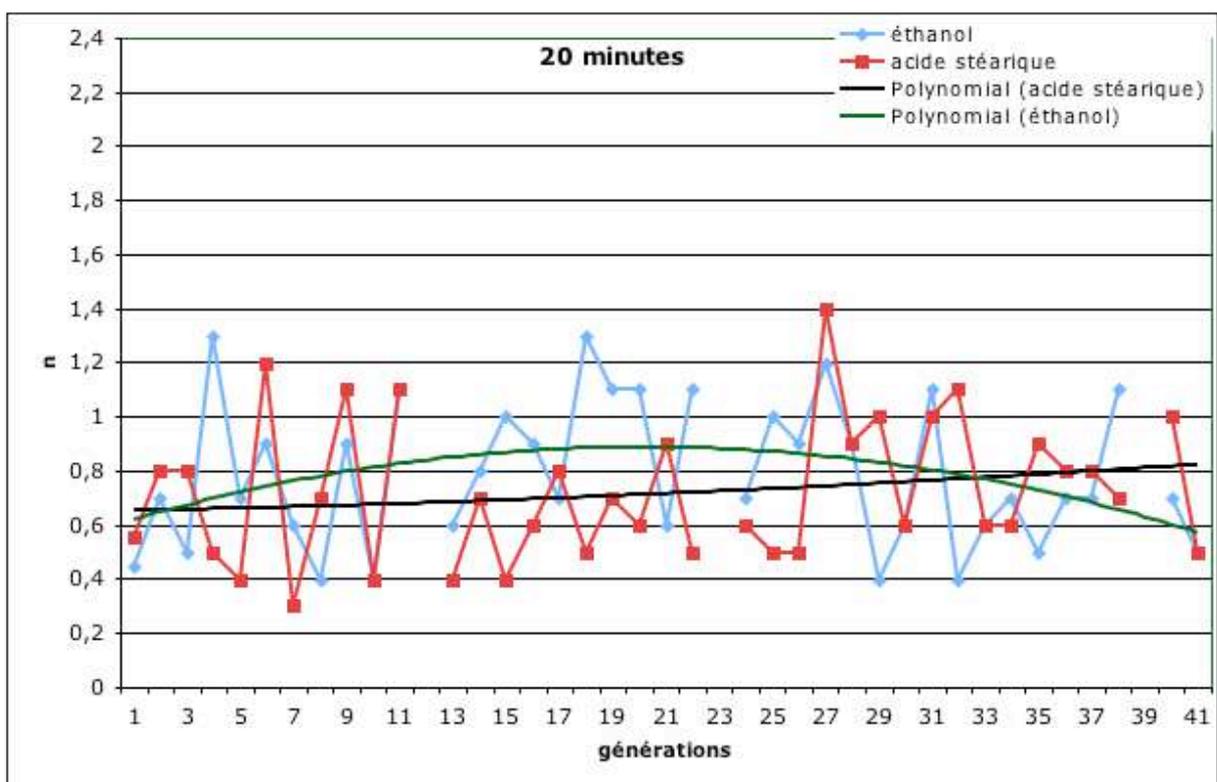
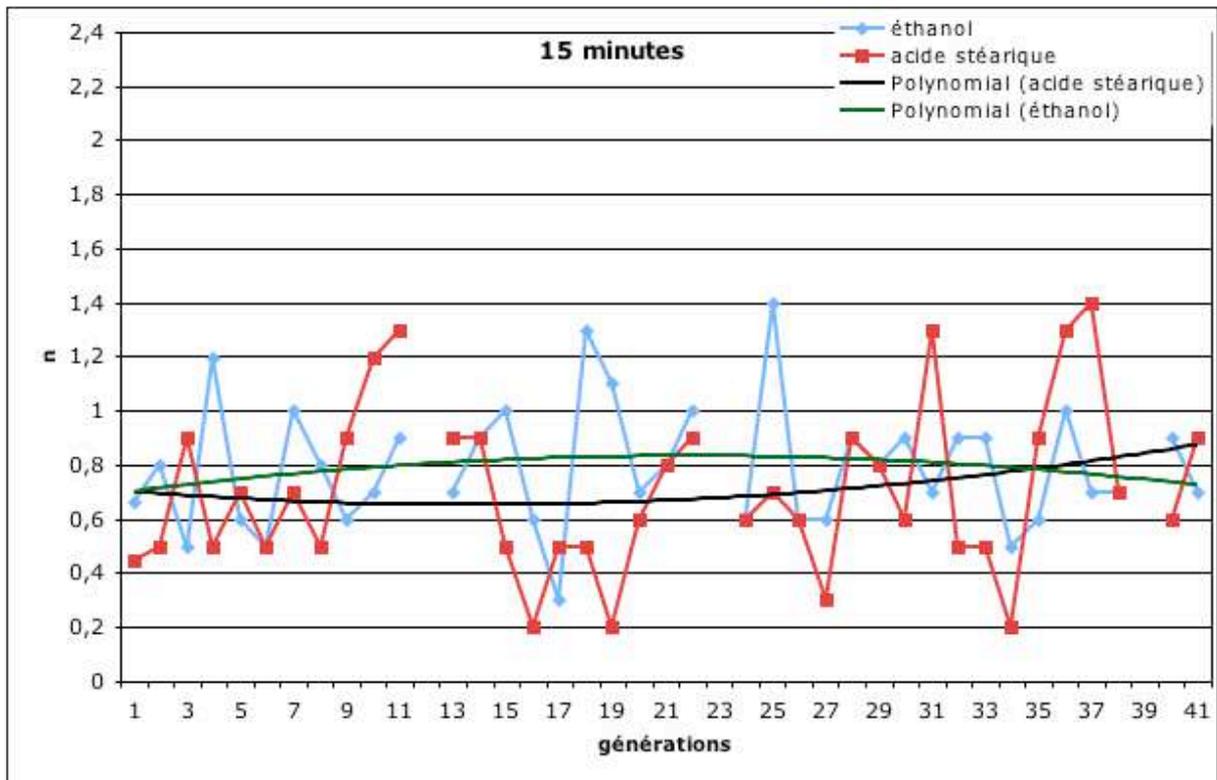
milieux. Ces résultats suggèrent que le défaut de perception du C18:3 des larves provenant d'un milieu carencé en AGs, ne proviendrait pas d'une différence de composition en AGs des larves par rapport à des larves élevées sur un milieu témoin.

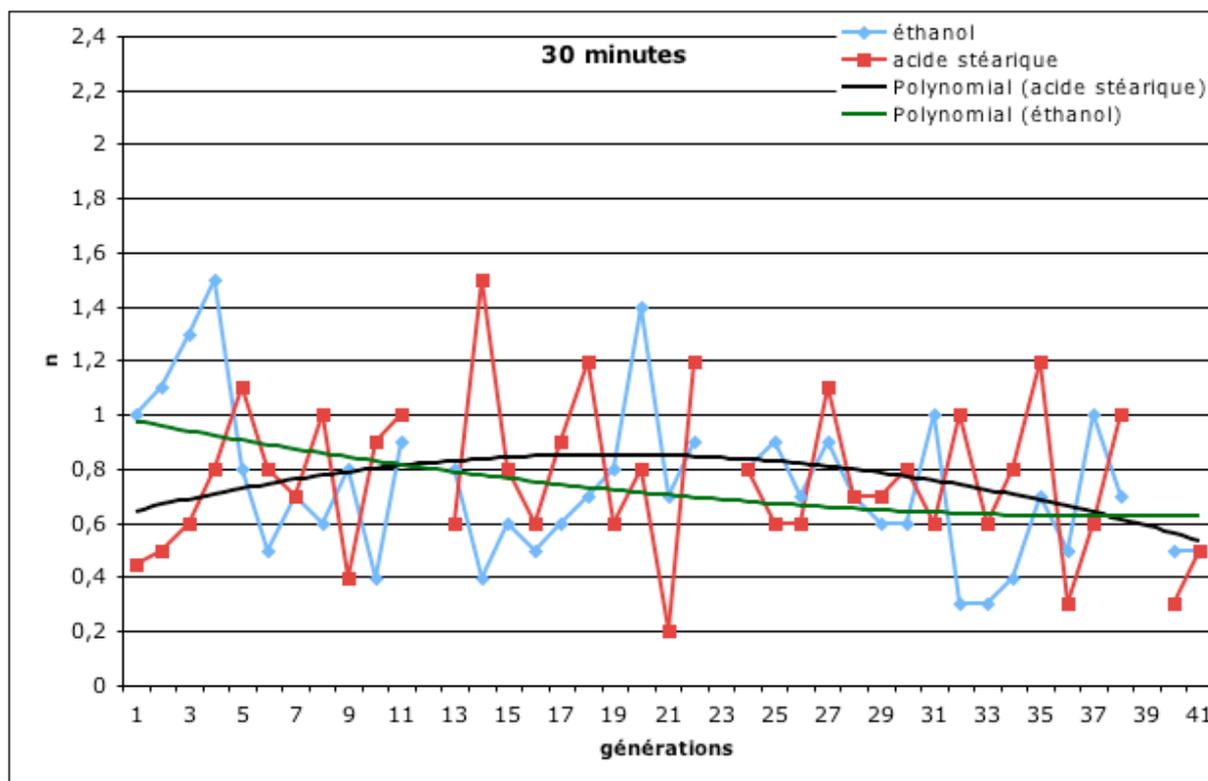
3.4 Sélection expérimentale

Puisque les larves Di2 sont naturellement repoussées par le C18:0, et afin de déterminer si les gènes potentiellement impliqués dans la réponse envers cet AG peuvent être soumis à un processus de sélection expérimentale ; on a sélectionné pendant une quarantaine de générations, les larves Di2 dont le comportement d'évitement vis-à-vis du C18:0 était atténué. Notre but consistait à voir si les larves ainsi sélectionnées pouvaient à terme montrer un comportement d'indifférence, voire même une attraction, vis-à-vis du C18:0.

Les graphiques (figures 28 à 32) montrent qu'au fur et à mesure des générations, les larves sont de moins en moins repoussées par le C18:0. Les courbes de tendance commencent à se séparer à partir de la vingtième génération. Cependant, cet effet n'est visible que pendant les 5 premières minutes du test, car les courbes des réponses mesurées plus tardivement pendant le test (10', 15'..) montrent des réponses similaires entre les larves de la lignée sélectionnée et la lignée non sélectionnée.







Figures R28 à R32 : Test de sélection des larves Di2 sur le C18:0 (conc 10). La sélection consistait à ne garder (pour engendrer la génération suivante) que les larves montrant une aversion atténuée envers cet AG. Chaque point représente le nombre moyen de larve sur chaque spot (C18:0 en rouge, éthanol en bleu) après 5, 10, 15, 20 et 30 minutes de test, en fonction de la génération testée. Les courbes polynomiales représentent les courbes de tendance du nombre moyen de larves observées sur l'éthanol (en vert) et sur le C18:0 (en noir). n=10.

3.5 Etude avec les adultes

3.5.1 Labyrinthe en Y

Dans la partie précédente, nous avons montré que les larves étaient capables de discriminer les différents AGs présents dans leur nourriture. Comme les besoins énergétiques diffèrent au cours du développement, et chez les drosophiles entre la larve et l'adulte, nous avons voulu savoir si les préférences des adultes envers les différents AGs, changeaient aussi. Nous avons effectué plusieurs tests permettant de déterminer le comportement et la préférence des adultes envers les AGs. Tout d'abord, les drosophiles sont confrontées à l'odeur des AGs

avec un test en Y (utilisant un labyrinthe en Y) qui permet de piéger les drosophiles confrontées à un choix d'odeur pour les dénombrer et mesurer leur préférence.

Les drosophiles placées à jeun dans le dispositif, vont être attirées ou repoussées par les odeurs se dégageant des 2 tubes placés en Y à partir du tube de départ. Un dispositif de « nasse » empêche la mouche de ressortir du tube où l'odeur est placée, une fois qu'elle y est entrée.

On effectue ce test pour le C18:0 et le C18:3 à la plus forte concentration (conc 10) qui induisent les réponses les plus tranchées chez les larves. Pour chaque condition (adultes vierges ou non-vierges), on teste l'effet de chaque AG en présence d'éthanol. On compare les réponses obtenues grâce à l'indice d'olfaction IO. Si $IO < 0$, cela indique que la majorité des drosophiles a choisi l'éthanol. Si $IO > 0$, la majorité des drosophiles a choisi l'AG. Dans ces tests, nous avons testé séparément mais simultanément des mouches des 2 sexes, vierges ou non, envers le C18:0 et le C18:3, et nous avons comparé ces résultats avec des tests témoins (où les 2 branches de l'olfactomètre en Y contiennent de l'éthanol, en vert sur les figures).

Envers le C18:0, les mouches mâles et femelles (qu'elles soient vierges ou non) ne montrent pas de préférence significative (figure 33).

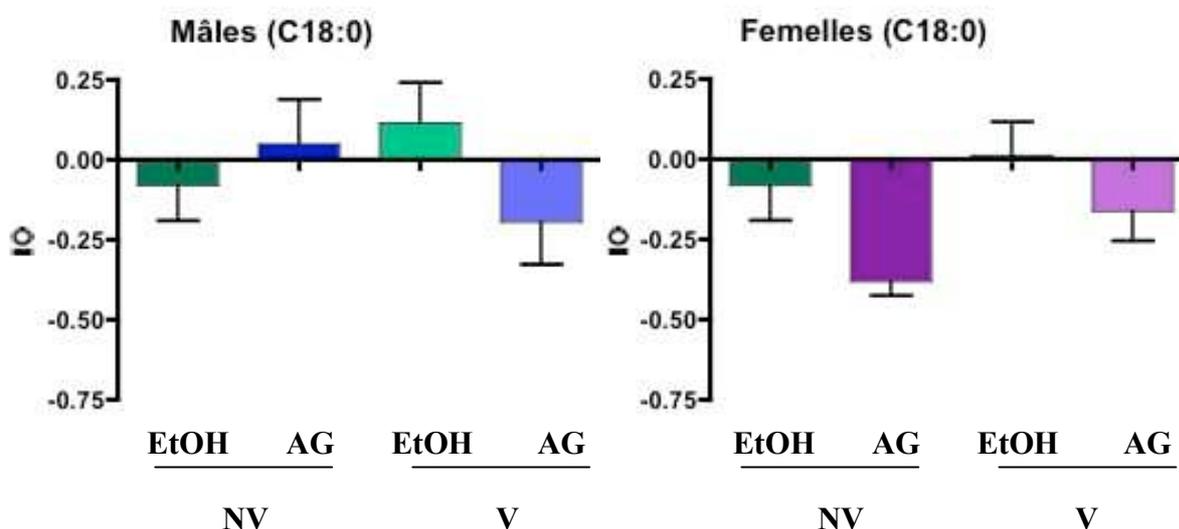


Figure R33 : Réponses des mâles et des femelles adultes envers le C18:0 dans l'olfactomètre en Y. Les adultes non-vierges (couleurs foncées ; NV) ou vierges (couleurs claires ; V) ont été testés soit pour le choix 2x EtOH (en vert), ou EtOH vs C18:0 (conc 10 ; en bleu ou violet) (Pour les mâles : $KW(4df)=3,018$; $p=$ non significatif ; pour les femelles : $KW(4df)=8,974$; $p=$ non significatif. $n=12$).

Avec le C18:3 (qui a un très fort pouvoir attractif pour les larves), les résultats (figure R34) sont très différents de ceux observés pour le C18:0, car les drosophiles (mâles et femelles, vierges ou non) évitent généralement cet AG. Les femelles sont un peu plus significativement repoussées que les mâles, ce qui indique qu'elles sont donc plus sensibles que les mâles au C18:3.

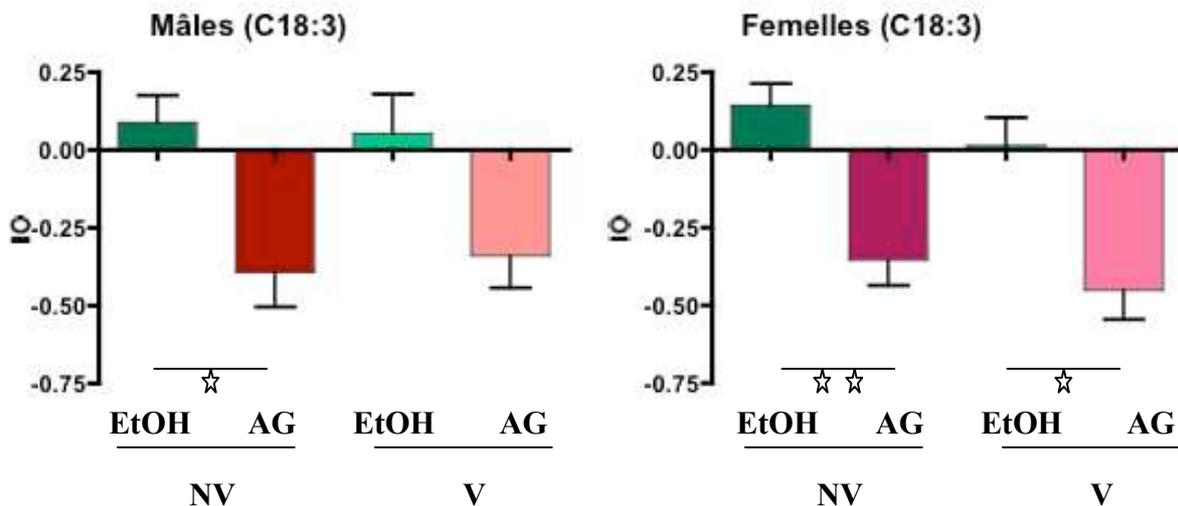


Figure R34 : Réponses des mâles et des femelles adultes envers le C18:3 dans l'olfactomètre en Y. Les adultes non-vierges (couleurs foncées) ou vierges (couleurs claires) ont été testés soit pour un choix 2xéthanol (en vert), ou éthanol vs C18:3 (conc 10 ; en orange ou rose) (Pour les mâles : KW(4df)=13,61;p=0,0035 ; pour les femelles : KW(4df)=21,74; p<10⁻⁴. n=12.

Ainsi, le C18:0 qui repousse les larves, n'a pas d'effet répulsif sur les adultes, alors que le C18:3, qui attire les larves, repousse fréquemment les adultes. Ces résultats suggèrent donc un changement des préférences pour les AGs lors des différentes phases de la vie de la drosophile.

3.5.2 Tests de gustation (PER)

3.5.2.1 PER chez les lignées sauvages Di2 et CS

Pour tester la réponse gustative des adultes envers les AGs, nous avons réalisé le test de PER (Proboscis Extension Reflex). Il s'agit de tester si la substance déposée sur la patte avant de la mouche déclenche, ou non, une réaction comportementale : elle étend son proboscis seulement si elle est stimulée par celle-ci, mais pas si elle y est indifférente ou

repoussée. Les observations préliminaires réalisées avec les six AGs seuls (conc 10), ne montrent aucune réponse de PER. Pour mesurer la possibilité d'inhibition ou de répulsion, nous avons donc appliqué l'acide gras en même temps que la solution de glucose (double stimulation). Comme le glucose favorise l'extension du proboscis, si la mouche le rétracte avec l'AG, ceci signifie que cet AG induit un effet répulsif. On mesure donc un pourcentage de rétractation du proboscis, correspondant au taux de répression du PER suivant la stimulation avec le glucose (figure R35).

Chez les mâles Di2, parmi tous les AGs testés (conc 10), seul le C18:3 est répulsif (37%). Les autres AGs répriment faiblement la réponse au glucose (27% pour le C18:2; 23% pour le C18:1; 27% pour le C18:0; 30% pour le C16:0 et 27% pour la C14:0). Par contre, les femelles sont plus sensibles que les mâles aux AGs. Le C18:3 réprime 67% des réponses au glucose ; le C14:0 et le C18:2 répriment environ 45% des réponses alors que les autres AGs ont un effet moindre.

Les profils de réponse obtenus avec la lignée CS sont proches de ceux obtenus avec la lignée Di2. Néanmoins les femelles CS montrent une répulsion moins marquée que les femelles Di2. Le C18:3 réprime 57% de la réponse au glucose chez les CS, et les autres AGs testés répriment moins fortement la réponse (53% pour le C18:2; 30% pour le C18:1; 47% pour le C18:0 ; 40% pour le C16:0 et 47% pour le C14:0). En ce qui concerne les mâles CS, le C18:3 et le C18:2 répriment fortement le PER (60% et 63% respectivement). Le C18:0 et le C18:1 et la répriment respectivement 40% et 33% des réponses. Les C16:0 et C14:0 répriment 30% du PER.

Ainsi, les adultes des 2 lignées sont repoussés « gustativement » par des AGs insaturés qui attirent les larves (et principalement le C18:3).

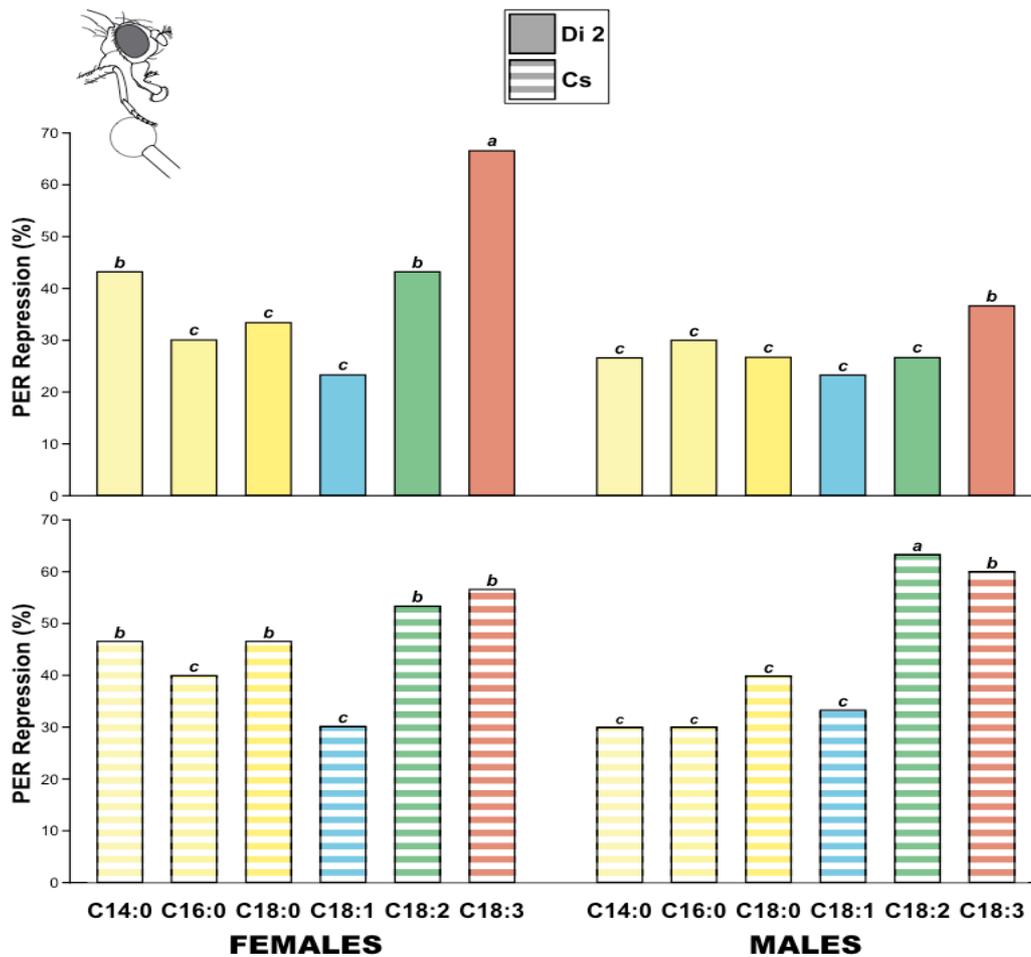


Figure R35 : Résultats du test PER avec les Di2 et les CS, en fonction des différents AGs testés (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. (Di2 : $\text{Khi}^2(11\text{df})=22,3$; $p=0,022$; CS : $\text{Khi}^2(11\text{df})=19,8$; $p=0,048$). $n= 30$ individus pour chaque AG et chaque sexe.

3.5.2.2 PER chez la lignée mutante CheB42a

Les larves possédant le transgène B42-Gal4 montraient une réponse globalement similaire aux AGs comparée aux larves témoins. Cette protéine n'est exprimée que dans 10 soies gustatives des pattes prothoraciques des mâles et est requise pour la perception gustative des phéromones. Etant donné la proximité structurale des phéromones cuticulaires des drosophiles et des AGs testés ici, CheB42a pourrait être impliquée dans la gustation des 2 types de molécules. Le PER nous a permis de tester le rôle de cette protéine dans la

perception adulte des AGs (figure R38). Nous avons testé deux AGs saturés et deux AGs insaturés (conc 10).

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec les Di2 (figure R36), indique que les femelles B42-Gal4 sont moins réprimées par les AGs insaturés que les femelles Di2 (pour le C18:3: 67% et 40%, respectivement ; pour le C18:1: 43% et 23%). Les femelles possédant le transgène B42-Gal4 seraient donc moins sensibles à ces deux AGs insaturés. Par contre, les femelles B42-Gal4 et Di2 montrent une réponse similaire envers les deux AGs saturés testés. Les mâles mutants sont un peu moins réprimés par les AGs insaturés que les mâles Di2 (30% et 37% respectivement pour le C18:3; répulsion similaire pour le C18:2 chez les 2 mâles). Cependant, la situation est inversée avec les AGs saturés : le C18:0 réprime 73% des mutants CheB42a contre 27% pour les Di2 alors que le C14:0 réprime respectivement 47% et 27% des réponses chez ces 2 mâles).

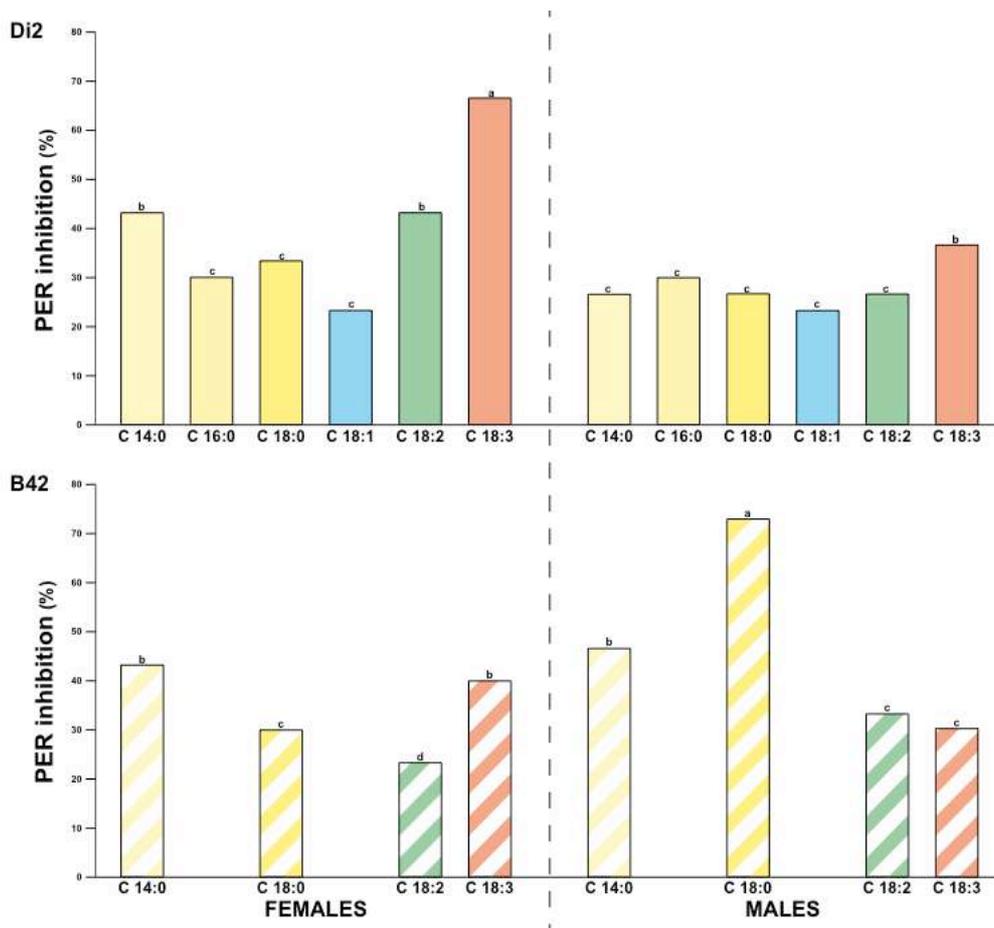


Figure R36 : Résultats du test PER avec la lignée mutante CheB42a (B42), avec différents AGs (conc 10). Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives.

CheB42a : $Khi_2(7df)=21,6$; $p=0,003$). Les données montrées pour Di2 proviennent de la Figure R35. $n= 30$ individus par AG et par sexe.

Les mâles possédant le transgène B42-Gal4 seraient donc plus fortement réprimés que les mâles témoins Di2 par les AGs saturés. Par contre, les mouches femelles mutantes montrent une réponse atténuée envers le C18:3 en comparaison des femelles Di2.

Discussion

Comme les acides gras (AGs) sont des molécules indispensables pour les êtres vivants, lors de notre thèse, nous voulions étudier la réponse des larves et des adultes de *Drosophila melanogaster* envers ces molécules afin de voir si les drosophiles sont capables de les percevoir. Ensuite, comme ces insectes semblaient capables de les percevoir et de les différencier, nous voulions étudier quelques facteurs biologiques sous-jacents à la modulation de leur réponse. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche visant à manipuler des gènes candidats de perception et/ou de métabolisme, et une approche visant à modifier le régime alimentaire en AGs. Nos résultats démontrent que les gènes et le régime en AGs peuvent avoir un impact spécifique sur certaines réponses des larves envers les AGs.

L'analyse de nos résultats nous conduit à poser plusieurs questions que nous discutons par la suite et qui pourront constituer autant d'axes pour de futures recherches dans le domaine de la perception et des préférences aux AGs : (1) Quels sont les systèmes sensoriels impliqués dans la perception des AGs ? (2) Quelles sont les contributions respectives des systèmes nerveux central et périphérique dans les réponses, et est ce que les réponses envers différents (types d') AGs peuvent être dissociées ? (3) Existe-t-il un lien entre l'état métabolique et la préférence des AGs et quelle est sa nature ? (4) Quelles sont les bases génétique, évolutive et écologique du changement de préférence des AGs au cours du développement et est ce que ces préférences peuvent être modifiées suite à une exposition à ces substances ?

1. Perception sensorielle des AGs par les drosophiles

Des études menées sur les rongeurs et les humains ont montré que les AGs étaient perçus par ces animaux, et qu'ils étaient capables de les différencier. Les AGs provoquent des réactions comportementales différentes selon la longueur de leur chaîne et leur concentration (Yoneda et al. 2007) (Saitou et al. 2009) (Stewart, Feinle-Bisset and Keast 2011). Ainsi, les rongeurs et les humains sont naturellement attirés par le C18:2 à faible concentration, alors qu'à plus forte concentration, cet AG provoque une répulsion.

Il a été démontré que les insectes pouvaient percevoir les AGs, et en particulier les insectes hématophages comme les moustiques. Certains AGs —entrant dans la composition d'un mélange incluant aussi le CO₂ et l'acide lactique— attirent certains insectes (Knols and

DeJong 1996, Bosch et al. 2000, Smallegange et al. 2009), alors que d'autres AGs peuvent être répulsifs (Mullens et al. 2009).

Nous avons aussi montré que l'espèce *Drosophila melanogaster*, espèce modèle de laboratoire, était également capable de percevoir les AGs. Nos premières expériences montrent clairement que les larves de drosophile sauvages (Di2 et CS), élevées sur un milieu standard de laboratoire, sont capables de percevoir et de différencier les AGs (figure R1). Les AGs insaturés proposés sur un papier filtre attirent les larves sauvages de façon dose-dépendante, alors que les AGs saturés sont répulsifs.

Il semble que lorsqu'un AG est déposé dans l'arène de test, les larves le perçoivent d'abord grâce à leur système olfactif, puisque qu'elles parcourent plus de chemin quand elles sont en présence d'un AG, saturé ou insaturé (figure R2). Ainsi, les AGs pourraient émettre une odeur, qui attirerait la larve. Celle-ci serait alors plus motivée pour se déplacer et explorer l'enceinte de test puisqu'elle sentirait une odeur évoquant peut-être une source de nourriture. Cet effet est particulièrement clair avec le C18:3 qui semble être perçu à distance car les larves se dirigent directement dessus avant même d'être en contact avec lui (figure R4). Le fait qu'elles ne montrent aucune préférence quand elles sont confrontées au test « C18:0 vs C18:1 », suggère qu'elles ne peuvent pas différencier ces deux AGs par olfaction. Il est possible aussi que les odeurs des deux AGs se mêlent dans l'enceinte de test, provoquant une confusion quant à la zone à choisir pour la larve. Afin de comparer les effets olfactifs de multiples AGs, il faudrait les tester simultanément en associant, par exemple deux AGs saturés ou deux AGs insaturés.

Les larves pourraient aussi percevoir les AGs grâce à leur système gustatif notamment quand elles se trouvent en contact avec ces molécules. Lors du contact avec les AGs insaturés, elles passent plus de temps dessus et leur activité locomotrice diminue. Lorsqu'elles sortent d'une zone recouverte de certains AG insaturés, elles tendent à y retourner, ce qui indique qu'elles aiment ces substances. C'est particulièrement le cas pour le C18:3, sur lequel les larves sauvages retournent fréquemment (2^{ème} visite), alors qu'elles ne retournent plus, ou peu fréquemment, sur les autres AGs. Ceci indique que les larves pourraient mémoriser, au moins à court terme, leur expérience immédiate avec un AG. En revanche, après leur premier contact avec les AGs saturés, elles évitent souvent de retourner sur ces AGs. Ceci indique que les AGs à longue chaîne seraient perçus par contact, peut-être par gustation et/ou par des mécanorécepteurs.

En effet, il est possible que le système mécanosensoriel intervienne dans la perception des AGs à longue chaîne qui possèdent une composante texturale. Yu *et al* (2007) ont démontré que les AGs seraient irritants et stimuleraient les noci-récepteurs du nerf trigéminal des rats. Il a également été démontré que les AGs pouvaient activer des canaux mécanosensoriels chez *Caenorhabditis elegans* (Kung 2005) similaires à ceux existants chez la drosophile (Kernan, Cowan and Zuker 1994, Cheng et al. 2010). Il est donc possible que les larves de drosophiles ressentent les AGs par l'intermédiaire de ces canaux.

Le rôle de la mécanosensation est particulièrement visible lors des tests consistant à placer une ou plusieurs larves directement sur un AG saturé à forte concentration (figure R8). Que ce soit avec des larves individuelles ou avec un groupe de larves, on observe des comportements très inhabituels chez ces larves qui se roulent sur elles même, se redressent et effectuent de fréquents demi-tours sur la zone couverte d'AG saturés. Le phénomène de « boule » —sorte de pelote d'agrégation— s'il est observé uniquement avec les groupes n'est apparemment pas lié à la dynamique de sortie ralentie en dehors la zone d'AG saturés qui se produit dans les deux cas. Nous n'avons aucune explication tranchée concernant la formation de cette boule, car elle pourrait tout aussi bien découler d'une recherche de support physique (constitué par les autres larves) pour éviter le contact avec l'AG « irritant » et/ou d'une agrégation induite par des phéromones de stress émises par les autres larves « irritées ». La formation de la boule pourrait tout aussi bien résulter de l'addition de ces deux phénomènes (évitement du contact avec le substrat + rapprochement par une phéromone d'agrégation).

L'effet Allee (Allee effect) pourrait expliquer le premier versant de ce phénomène. Les larves se protégeraient de l'effet irritant de l'AG en se regroupant, comme pour augmenter leur chance de protection (Rohlf's and Hoffmeister 2003, Tobin, Bercé and Liebhold 2011). La situation de stress à laquelle les larves doivent faire face, provoquerait un phénomène d'agrégation. Dans une situation de stress, les larves pourraient émettre un signal d'agrégation —qui demeure encore hypothétique— et qui pourrait rappeler l'émission de CO₂ chez les adultes en situation de stress (Suh et al. 2004). Chez les drosophiles adultes, le comportement d'agrégation est provoqué par le *cis*-vaccenyl acetate (cVA), qui est une phéromone volatile dérivée d'AGs (Wertheim et al. 2002). Le cVA est une phéromone synthétisée uniquement par les mâles, transmise à la femelle lors de l'accouplement, puis déposée lors de l'oviposition sur les sources de ponte et de nourriture des drosophiles. Ainsi, le cVA combiné

à des odeurs volatiles de nourriture, induit à une distance relativement élevée, l'agrégation des adultes (Bartelt et al. 1985). De manière analogue, chez les larves, il est possible que l'effet d'agrégation initialement induit par contact avec un AG saturé soit renforcé par l'émission d'une phéromone d'agrégation.

Pour commencer à valider l'hypothèse suivant laquelle cette agrégation serait induite par une phéromone, nous avons mesuré la réponse de drosophiles mutantes pour le gène *desat1* (1573). Ce gène est impliqué dans le métabolisme et dans l'émission et la perception des hydrocarbures cuticulaires chez les drosophiles adultes (Marcillac et al. 2005a, Marcillac et al. 2005b). En présence d'AG saturé, les larves ne sont pas ou peu repoussées, contrairement aux larves témoins, et elles réagissent comme sur des AGs insaturés. Cependant, si les larves 1573 ne forment pas de boule, elles établissent des contacts pendant une durée similaire et leur activité locomotrice est proche de celles des larves sauvages. Comme l'absence de boule n'est pas liée à un problème locomoteur qui, sinon, empêcherait les larves mutantes de former des contacts inter-larvaires, et comme la mutation affecte un gène contrôlant —chez les adultes— l'émission et la perception des phéromones, il est possible que cette altération génétique empêche les larves mutantes d'émettre et/ou de recevoir cette phéromone hypothétique.

2. Bases neurogénétiques des comportements de réponse

A partir de la lignée sauvage Di2, nous avons réalisé deux tests de sélection consistant (1) soit à retenir les larves montrant une réponse de répulsion diminuée envers le C18:0 (= sélection expérimentale), soit (2) à élever cette lignée sur un milieu fortement carencé en AGs (lignée carencée). Dans les 2 cas, nous avons observé qu'après un nombre relativement élevé de générations (respectivement, environ 20 et 50), les larves ainsi sélectionnées montrent des variations de réponse relativement spécifiques que ce soit par rapport à la gamme des AGs testée, ou au cours de la durée du test expérimental. En tous cas, les résultats obtenus suggèrent que les gènes sous-jacents à la perception et/ou à la préférence des AGs peuvent être affectés par ces 2 types de manipulations. De plus, le fait que le processus de sélection soit relativement long et modifie de manière très lente certains aspects du comportement, suggère qu'il dépend de multiples gènes (Greenspan 2009). Nos résultats préliminaires suggèrent que les gènes contrôlent des aspects particuliers de la réponse —et non pas la réponse globale— envers les AGs. Il existerait donc plusieurs réseaux de neurones impliqués

dans plusieurs types de réponses et ces réseaux dépendraient de multiples interactions entre différents gènes, eux-mêmes interconnectés en réseaux (Greenspan 2001). Les résultats obtenus avec les manipulations des gènes *desat1* et *CheB42a* soutiennent cette hypothèse.

Concernant la sélection expérimentale, nous avons récupéré, pendant plusieurs générations, les larves dont la réponse envers le C18:0 était atténuée. Nos courbes montrent, au fur et à mesure des générations, que les larves sélectionnées ont tendance à se trouver un petit peu plus fréquemment sur le C18:0 que sur l'éthanol, ce qui suggère que les larves sélectionnées sont de moins en moins repoussées par cet AG. Le fait que l'expérience de sélection n'est efficace que pendant les premières minutes du test pourrait provenir du fait que notre protocole est établi pour sélectionner les larves surtout en début de test. Néanmoins, il semble être suffisamment discriminant pour nous permettre de séparer les larves sur la base de leur comportement envers le C18:0. Ce processus de sélection va être poursuivi au laboratoire afin de tester la réaction comportementale des larves sélectionnées placées directement sur le C18:0. Dans le cas d'une réponse altérée (par exemple, plus ou moins de phénomène de boule), il sera possible de comparer le taux de transcription des ARN dans les larves sélectionnées avec des larves non sélectionnées, en utilisant des microarrays. La PCR quantitative réalisée sur les meilleurs gènes candidats pourrait permettre de déterminer ceux qui ont été réellement affectés par cette expérience de sélection.

Nous avons donc initié un travail visant à perturber l'expression de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la perception des AGs ou de molécules proches (hydrocarbures). C'est la raison pour laquelle nous avons commencé à tester l'effet de manipulation sur les gènes *desat1* et *CheB42a*. Nous avons aussi l'ambition de tester des mutants pour le gène *Snmp*, mais pour des raisons de temps, nous n'avons pas encore obtenu de résultat.

Les défauts de réponse induits sur les larves et les adultes *desat1* sont relativement spécifiques et ne perturbent pas de manière considérable leur développement et leurs comportements généraux. Si les larves mutantes sont attirées par les AG insaturés, l'intensité de leur réponse envers ces AGs est plus faible (et ne varie plus de manière dose-dépendante) par rapport aux larves témoins (Di2 et N2). Les larves mutantes placées directement sur les AGs insaturés réagissent comme les larves témoins. Cependant, les larves mutantes placées sur les AGs saturés ne s'agrègent pas ensemble, contrairement aux larves témoins.

Ces résultats suggèrent que la mutation « 1573 » (correspondant à l'insertion d'un élément transposable PGal4) dans le gène *desat1* induit des effets spécifiques sur la réponse des larves envers certains —mais pas tous les— AGs. Nous avons voulu induire, de manière aussi restreinte que possible, une perturbation d'expression de *desat1* en utilisant la lignée UAS-RNAi *desat1* sous le contrôle de différents transgènes pilotes. L'effet de la lignée RNAi sur le niveau de transcription de *desat1* ainsi que sur les phénotypes phéromonaux adultes a été validé par d'autres membres du laboratoire (Bousquet et al.). D'autre part, ces mêmes auteurs ont étudié l'expression de *desat1* chez la larve et ont observé que plusieurs régions régulatrices de ce gène induisent une expression dans divers sous-ensembles du système nerveux, et en particulier dans le cerveau (Bousquet, non publié ; Figure A3). Comme les travaux réalisés dans notre équipe de recherche montrent qu'une perturbation cérébrale de *desat1*, chez le mâle adulte, conduit à une perte de la reconnaissance des hydrocarbures insaturés des partenaires sexuels (Bousquet et al. en révision). De manière analogue, l'expression de *desat1* pourrait être requise dans le système nerveux de la larve, et les perturbations de ce gène expliqueraient les modifications comportementales envers les AGs.

Les défauts des larves Elav/33 sont relativement spécifiques dans la mesure où ils affectent la perception aversive du C18:0, mais pas la réponse envers les AGs insaturés qui induisent même une attraction très élevée. De plus, la modification de la réponse répulsive (visible dans les tests d'« attraction de groupe » (Figure R 19) n'est pas détectée avec les tests mesurant les effets dynamiques de la répulsion (Figure R 20). Ceci indique que ces 2 tests offrent des visions complémentaires et permettent d'obtenir des résultats qui ne sont pas forcément comparables. D'autres travaux réalisés avec la drosophile adulte ont montré l'impact du design expérimental sur les résultats (Coyne, Elwyn and Rolan-Alvarez 2005).

Le ciblage du RNAi réalisé avec les différentes régions régulatrices de *desat1* suggère que la région RDio (-1102bp) pourrait contrôler les neurones (ou les tissus) impliqués dans la perception du C18:0. En effet, les larves RDio/33 ne montrent plus d'aversion significative envers cet AG. L'expression de RDio est particulièrement marquée dans le cerveau de la larve (Figure A3) ce qui suggère que le défaut des larves RDio/33 serait causé par une anomalie du système nerveux central. Il faut noter que chez le mâle adulte, c'est aussi la région régulatrice RDio qui est impliquée dans la perception des hydrocarbures insaturés (Bousquet et al, en révision).

De manière générale, le mutant 1573 ainsi que les autres lignées (différentes de RDio) transgéniques —et associées ou non au RNAi *desat1* —montrent une dynamique élevée de

sortie de la zone test, ce qui suggère que ces génotypes percevraient anormalement les AGs saturés. Ces tests de dynamique de répulsion pourraient fournir une information complémentaire par rapport au test d'attraction de groupe. Comme ces anomalies apparaissent dans le test de répulsion, mais pas dans le test d'attraction, il est possible que le rôle de ces autres régions régulatrices soit moins marqué ou qu'elles agissent de manière plus subtile sur certains aspects du comportement de répulsion. De plus, les témoins transgéniques, surtout RE-Gal4 et dans une moindre mesure RC-Gal4 (mais pas ou moins les génotypes expérimentaux RE/33, ni RC/33), montrent aussi des anomalies pour leur indice de groupe sur le C18:0. Le mutant RC-Gal4 montre aussi une durée de contact anormalement faible sur le C18:0 par rapport aux autres génotypes. Comme ces résultats indiquent que les transgènes comportant la séquence Gal4 pourraient, par eux-mêmes, modifier de manière subtile (car pas détectée par tous types de tests) le comportement, l'expression de la séquence Gal4 et l'accumulation de son produit dans certains tissus pourrait avoir un rôle toxique (Rezaval, Werbach and Ceriani 2007), et par conséquent produire des changements des comportements chimio-induits (Lacaille et al. 2007, Svetec and Ferveur 2005, Yang et al. 2008). Il sera donc crucial de mesurer l'indice de groupe des génotypes RDio et RDio/33 sur les trois AGs principaux.

D'autre part, les résultats obtenus avec la région RA suggèrent que les tissus (où cette région régulatrice pilote la perturbation de *Desat1*) pourraient être impliqués dans la perception et /ou la réponse envers les AGs insaturés. Les effets antagonistes obtenus avec les génotypes RA-Gal4 et RA/33 (Figures R15 et R16) suggèrent que le produit GAL4 seul induit une diminution de réponse, alors que son pilotage du RNAi induit des effets inverses. Cette hypothèse reste à valider, notamment en effectuant des tests d'attraction avec des larves individuelles.

Les larves transgéniques CheB42a-Gal4 ont été testées sans le RNAi *desat1* car les mâles adultes de cette lignée montraient des anomalies de discrimination des hydrocarbures phéromonaux (Svetec and Ferveur 2005) laissant supposer que l'expression et/ou l'accumulation de GAL4 dans les tissus impliqués dans la perception chimiosensorielle provoquerait cette perturbation comportementale. Il a été récemment montré que la famille des protéines CheBs était liée à la famille des GM2-AP humaine (Starostina et al. 2009). Or cette famille de protéines lie les lipides. Quand on observe la dynamique de sortie de la zone couverte d'AG saturé, les larves CheB42-Gal4 montrent des défauts assez proches de ceux notés pour la plupart des transgènes construits avec les régions régulatrices de *desat1* fusionné

à Gal4. Ceci indique que leur perception des AGs saturés est partiellement déficiente. Les résultats obtenus avec les tests d'attraction suggèrent aussi une perception anormale de l'éthanol quand il est présenté concurremment à un AG saturé, mais pas avec un AG insaturé. Il est donc possible que la modification de réponse envers l'éthanol résulte indirectement d'une anomalie de perception des AGs saturés, par exemple en modifiant la capacité de discrimination des larves transgéniques placées devant ce genre de choix.

Les effets du transgène *CheB42-Gal4* ont aussi été évalués chez des adultes sur lesquels l'effet répressif de certains AGs a été mesuré grâce au PER. Les tests effectués sur la lignée transgénique pour le gène *CheB42a* suggèrent que cette protéine pourrait être impliquée dans la perception des AGs saturés par les mâles. Globalement les femelles *CheB42-Gal4* répondent aux AGs de la même façon que les femelles témoins Di2, avec néanmoins un effet répressif moins fort du C18:3 chez les transgéniques. En revanche, les mâles *CheB42-Gal4*, qui ont des problèmes de perception des phéromones (Svetec and Ferveur 2005), sont aussi plus fortement réprimés que les mâles témoins Di2 par les AGs saturés. Or la protéine CHEB42a n'est exprimée que dans 10 soies gustatives des pattes prothoraciques des mâles et est requise pour la perception gustative des phéromones. La protéine CHEB42a pourrait donc également jouer un rôle dans la perception des AGs saturés, et être impliquée dans le système nerveux périphérique.

Le dimorphisme sexuel de l'expression de la protéine CHEB42a est un cas particulier de la famille des CHEBs (Xu et al. 2002), il serait donc judicieux de vérifier l'implication de ces protéines dans la perception des AGs en réitérant ces expériences avec d'autres mutants de cette famille comme CHEB38a, qui est également impliquée dans la détection des phéromones (Starostina et al. 2009).

Si la manipulation des gènes *desat1* et *CheB42a* produisent des résultats convergents, suggérant que la perception des phéromones et des AGs serait liée, d'autres candidats pourraient aussi être impliqués. Par exemple, chez la drosophile, le gène *Snmp1* est impliqué dans la perception du *cis*-vaccenyl acétate (cVA), phéromone mâle dérivée d'AG (Benton et al. 2007). Comme la protéine SNMP1 est l'homologue du récepteur CD36 des mammifères qui lie les AGs (Baillie et al. 1996), les drosophiles mutantes pour *Snmp1*, pourraient aussi montrer des défauts de perception des AGs. Nous avons reçu, du laboratoire du Dr Benton, plusieurs lignées mutantes (*Snmp1* et *Snmp2* ; Benton et al. 2007), mais nous avons passé

plusieurs mois à nettoyer leur génome et en particulier à nous débarrasser des balanceurs chromosomiques qui causent souvent des anomalies comportementales. Ces lignées seront prêtes à être testées pour continuer ce travail d'exploration.

3. Métabolisme et perception

Le lien entre métabolisme et perception a été abordé de plusieurs manières lors de notre thèse. Nous avons utilisé le mutant du gène *desat1* connu pour être impliqué dans le métabolisme de la drosophile (Baker and Thummel 2007). Si ce rôle a été démontré chez l'adulte (Ueyama et al. 2005), il pourrait aussi jouer un rôle vital sur le métabolisme de la larve (Marcillac et al. 2005b, Kohler et al. 2009) en altérant peut-être la biosynthèse des AGs nécessaires à la mue de 3^{ème} stade larvaire car les individus mutants amorphes restent « bloqués » en 2^{ème} stade larvaire pendant 7 à 10 jours (normalement ce stade dure 24h) avant de mourir. Pour le moment, on ne connaît pas la nature des AGs essentiels qui seraient potentiellement impliqués dans cet aspect du développement.

Pour essayer d'agir sur le métabolisme sans manier d'outil génétique (mais en pouvant quand même influencer des aspects épi/génétiques), nous avons élevé des drosophiles sauvages pendant une cinquantaine de générations sur un milieu appauvri en AGs. Les effets précoces de cette « diète » se sont fait ressentir sur la robustesse de la lignée qui a eu des difficultés à survivre et à se reproduire pendant les premières générations. De plus, et jusqu'à maintenant, nous avons aussi noté un allongement substantiel du développement allant de l'embryon à la mue en 3^{ème} stade larvaire (7 jours au lieu de 4 jours chez le témoin, à 25°C). Les larves « carencées » en AGs ne révèlent pas de différence de composition en AGs libres avec les larves témoins (élevées sur un milieu standard ; J-P Farine, résultats non publiés). Il est possible que les défauts de biosynthèse perturbent uniquement certains tissus, ne rendant pas l'analyse globale assez précise pour révéler de telles différences. Il est aussi possible que le type d'analyse utilisée (Chromatographie en phase gazeuse) ne soit pas adapté à la comparaison de 2 types de larves. D'autres études avaient démontré que des facteurs comme la température ou le milieu sur lequel était élevées les drosophiles, pouvaient aussi influencer leur composition en AGs (Geer and Perille 1977, Stark et al. 1993). Il est possible que si la composition en AGs des larves change, les besoins nutritionnels, et en particulier l'apport en AGs, puisse également varier.

Les larves carencées montrent des performances différentes par rapport aux larves témoins. Le carencement semble surtout affecter la réponse des groupes de larves envers le C18:3 que celui-ci soit présenté concurremment à l'éthanol ou au C18:0. Dans les deux cas, les larves carencées montrent une absence de préférence pour l'AG insaturé. Cette différence spécifique semble être robuste car l'observation du comportement de larves individuelles carencées montre qu'elles ne choisissent plus de manière préférentielle le C18:3, qu'elles passent moins de temps sur cet AG et ne ralentissent plus leur activité locomotrice quand elles se trouvent au contact de cet AG. La modification cohérente de ces 3 paramètres suggère que le carencement en AGs affecte la perception olfactive et gustative des larves et donc qu'il existerait peut-être un lien entre ces deux modalités chimiosensorielles, au moins d'un point de vue fonctionnel, et peut être aussi dans leurs bases biologiques. En d'autres termes, la privation récurrente d'AGs dans le milieu d'élevage perturberait d'une manière commune les réseaux chimiosensoriels impliqués dans la perception du C18:3. Alternativement, il est possible que les larves carencées montrent une discrimination moins élevée dans les tests de choix car elles seraient attirées de manière égale par les AGs saturés et insaturés. Cependant, cette hypothèse est moins probable car la perturbation de réponse au C18:3 est non seulement observée dans les tests impliquant le choix entre 2 AGs, mais aussi dans ceux mettant en concurrence le C18:3 et l'éthanol.

Il serait intéressant de tester la réaction d'une lignée provenant de milieux enrichis avec un ou plusieurs AGs. Il a été démontré que la présence et la composition en AGs du milieu d'élevage pouvait influencer le développement des drosophiles (Jowett and Sang 1979). L'enrichissement du milieu pourrait donc également influencer la perception des AGs par des lignées « enrichies » et changer leurs préférences envers certains de ces AGs. Cette approche est aussi intéressante par rapport à la thématique sociétale qui vise à mieux comprendre les effets d'une surconsommation de lipides sur le comportement du consommateur. Si on a établi depuis plusieurs décennies une corrélation entre le régime en lipides, l'apparition de maladies cardiovasculaires et la fréquence de certains cancers (Haslam and James 2005), les effets du régime en AGs sur la consommation, et surtout sur la perception des AGs ont été peu explorés. Dans ce sens, le modèle Drosophile offre un avantage irremplaçable car il permet d'obtenir rapidement un grand nombre de générations d'individus élevés sur différents milieux, provenant d'ancêtres communs, afin de les comparer.

D'autres gènes connus pour modifier le métabolisme des lipides, ont été étudiés chez la drosophile. Ainsi, le gène *dSREBP* code des facteurs de transcriptions cruciaux pour une synthèse normale des lipides (Kunte et al. 2006). Les mutants pour ce gène montrent des défauts de croissance tout en conservant une composition en AGs similaire à celle des drosophiles sauvages (de manière analogue à nos larves provenant du milieu carencé). Il pourrait être instructif de mesurer le taux de transcription de *dSREBP* ainsi que le comportement envers les AGs des larves carencées.

4. Changement de préférence au cours du développement

Nos résultats montrent clairement que les larves et les adultes drosophiles sont capables de percevoir et de différencier les AGs présents dans leur environnement. Cette perception s'effectuerait grâce à l'olfaction, à la gustation et peut-être par mécanosensation. Nos résultats ainsi que ceux obtenus par d'autres chercheurs de l'équipe (en particulier Justin Flaven-Pouchon) confortent notre supposition que la préférence pour certains AGs pourrait varier au cours de la vie de l'animal. Si ce résultat était envisageable, étant donné les différents besoins énergétiques entre la larve et l'adulte du fait de leurs modes de vie différents, cela pose un certain nombre de questions toutes liées, tant d'un point de vue génétique, évolutif, qu'écologique.

Le mode de vie des adultes et des larves est très différent. C'est pourquoi nous avons également étudié la perception des AGs chez les adultes, afin de déterminer si un changement de perception se produisait au cours de la vie. Il a été démontré que la composition en AGs variait au cours de la vie de l'individu (Green and Geer 1979, Larsenrapport 1986, Kunte et al. 2006). La composition varie selon le développement et le sexe. Basé sur le fait que les besoins énergétiques sont différents au cours de la vie, il est compréhensible, tant d'un point de vue écologique qu'évolutif, que la perception soit modifiée par le changement de mode de vie, afin de permettre de répondre le plus efficacement possible aux besoins énergétiques des individus.

Nous avons mesuré les réponses gustative (PER) et olfactive (olfactomètre en Y) des adultes. Dans l'olfactomètre en Y, le C18:3 (attractif pour les larves) est très répulsif chez les adultes non-vierges ainsi que chez les femelles vierges. Dans ces expériences, l'indice IO compris entre -0.35 et -0.40, indique qu'environ 70% des mouches sont repoussées par cet

AG. Si les mâles vierges ne sont pas significativement repoussés par le C18:3, ils montrent une forte tendance à la répulsion. Si l'état physiologique (non/vierge) de la mouche ne semble pas influencer grandement la perception de cet AG, les femelles semblent y être plus sensibles que les mâles. Un dimorphisme sexuel a également été décrit sur la survie différente des mâles et femelles adultes de la lignée Di2 exposés de manière permanente à du milieu enrichi avec deux AGs insaturés (C18:1, C18:3 ; J Flaven-Pouchon, communication personnelle ; Fougeron et al. en révision). Les femelles sont également plus sensibles au glucose, aux substances amères ainsi qu'à la phéromone 7-tricosène (Meunier, Ferveur and Marion-Poll 2000, Lacaille, Everaerts and Ferveur 2009).

Le C18:0 ne semble induire aucune réponse marquée, même si les femelles vierges montrent une tendance à éviter cet AG. De manière analogue, les tests de ponte et de survie montrent des réponses cohérentes (J Flaven-Pouchon, communication personnelle ; Fougeron et al. en révision). Le C18:0 ne semble pas modifier le choix du site de ponte des femelles par rapport à un milieu neutre, et la survie des adultes est similaire sur ces 2 milieux. Ces résultats contrastent avec les résultats obtenus avec milieux enrichis avec des concentrations élevées de C18:1 et C18:3. Sur ces milieux, les femelles pondent rarement des œufs, et la survie des adultes est raccourcie par rapport à la condition témoin.

Nous pouvons formuler une critique méthodologique par rapport au test d'olfactométrie en Y. Comme nos études ont été menées avec des groupes de 20 drosophiles mâles ou femelles, il pourrait y avoir un biais lié à un effet pionnier. En effet, un petit nombre de drosophiles se déplaçant d'un côté pourrait rapidement émettre une phéromone d'attraction (dans le cas du C18:0) ou de répulsion (C18:3) ce qui influencerait sur le choix effectué par les autres drosophiles du test, c'est à dire sur la majorité des individus comptabilisés dans l'indice IO. Un tel effet a déjà été mesuré sur la cinétique d'agrégation des mouches dans une enceinte de très grande taille et en présence de différentes molécules alimentaires induisant des effets attractifs ou répulsifs (Tinette, Zhang and Robichon 2004). Afin de remédier à ce biais, de nouveaux tests pourraient être réalisés individuellement et être basés non seulement sur le choix de l'odorant, mais aussi sur le temps mis par chaque individu pour effectuer ce choix.

Pour valider l'hypothèse suivant laquelle le C18:3 serait perçu par olfaction chez les adultes, il serait possible de tester le comportement de mutants Orco (mutant pour *Or83b*, cofacteur nécessaire à l'expression de la plupart des récepteurs olfactifs (Benton et al. 2006).

La mesure de l'effet gustatif des AGs avec le test du PER montre aussi une réponse bien différente par rapport aux larves. Les deux AGs insaturés C18:3 et C18:1 répriment fortement la réponse au glucose (alors qu'ils provoquaient l'attraction des larves). Ces résultats corroborent les résultats obtenus avec l'olfactomètre en Y. Cependant, même si le profil de réponse envers les différents AGs est assez proche chez les 2 lignées témoins Di2 et CS, on note des petites différences. Les femelles Di2 montrent une réponse légèrement accrue envers les différents AGs par rapport aux femelles CS alors que les mâles CS semblent plus sensibles aux AGs insaturés que les mâles Di2. Ces différences pourraient dépendre du fond génétique, dont nous avons précédemment supposé qu'il pouvait contenir de multiples gènes agissant sur de subtils aspects de la réponse aux AGs. Ces différences pourraient aussi refléter des différences métaboliques entre génotypes.

Sur les plans écologique et évolutif, l'inféodation stricte à un milieu expliquerait certaines relations « plante-insecte » très étroites. À l'opposé, il est possible que le changement de préférence entre la larve et l'adulte constitue une stratégie permettant aux individus de l'espèce d'occuper des niches écologiques plus variées, ce qui pourrait expliquer le fait que l'espèce *D.melanogaster* se soit acclimatée à pratiquement tous les biotopes sur la planète. Ce changement impliquerait aussi que l'individu est capable de métaboliser différents AGs au cours de sa vie complète ou alors que son métabolisme change et s'adapte entre les différentes périodes de son développement. Des expériences sont planifiées, dans notre équipe de recherche, pour étudier l'effet d'une exposition transitoire à certains AGs au cours de la même génération. En d'autres termes, nous voudrions voir si, par exemple, des individus élevés pendant leur développement pré-imaginal sur du C18:3 montreraient, une fois adultes, des préférences différentes par rapport à des individus élevés, soit sur un milieu neutre, soit sur un milieu enrichi avec un AG saturé.

Une telle possibilité d'adaptation a été postulée chez les insectes à métamorphose complète : après une exposition pendant la vie larvaire sur du menthol, certains insectes, une fois adulte, montrent une modification de leur préférence envers cette molécule (Thorpe 1939, Alloway 1972). Cependant, les résultats obtenus avec le menthol, notamment en testant la drosophile, ont été remis en question d'un point de vue méthodologique (Tully, Cambiaso and Kruse 1994) (Barron and Corbert 1999). De plus, on ne sait pas si les insectes qui ont été testés montrent des changements de préférence envers cette substance, avant et après leur métamorphose. D'autre part, il a été suggéré, chez l'espèce *D.paulistorum* que l'expérience

pré-imaginale des larves aux hydrocarbures de congénères pouvait modifier leur comportement adulte de réponse envers ces composés (Kim, Koepfer and Ehrman 1996, Kim et al. 2004).

En conclusion, au cours de notre thèse, nous avons pu démontrer que les préférences envers les AGs saturés et insaturés varient au cours de la vie de la drosophile, peut-être en relation avec leurs besoins nutritifs. Les AGs semblent être perçus par olfaction, gustation, et peut être par mécanosensation.

Annexes

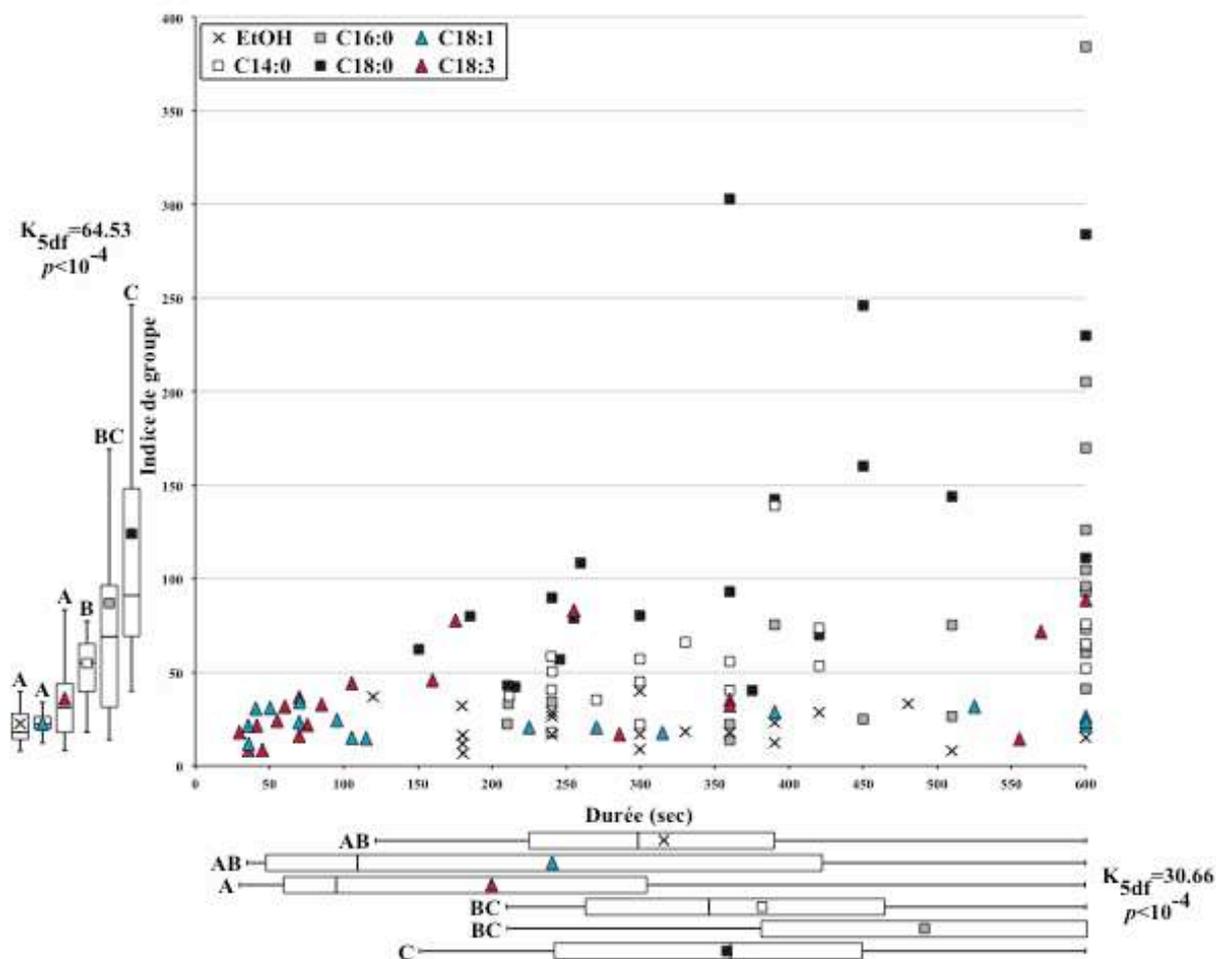


Figure A1 : Indice de groupe des Di2 en fonction de la durée des contacts (sec), selon les différents AGs testés (conc 10). En abscisse et en ordonnée sont représentées les boîtes de dispersion relatives aux différents AGs. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. Pour chaque AG et l'éthanol, n=10.

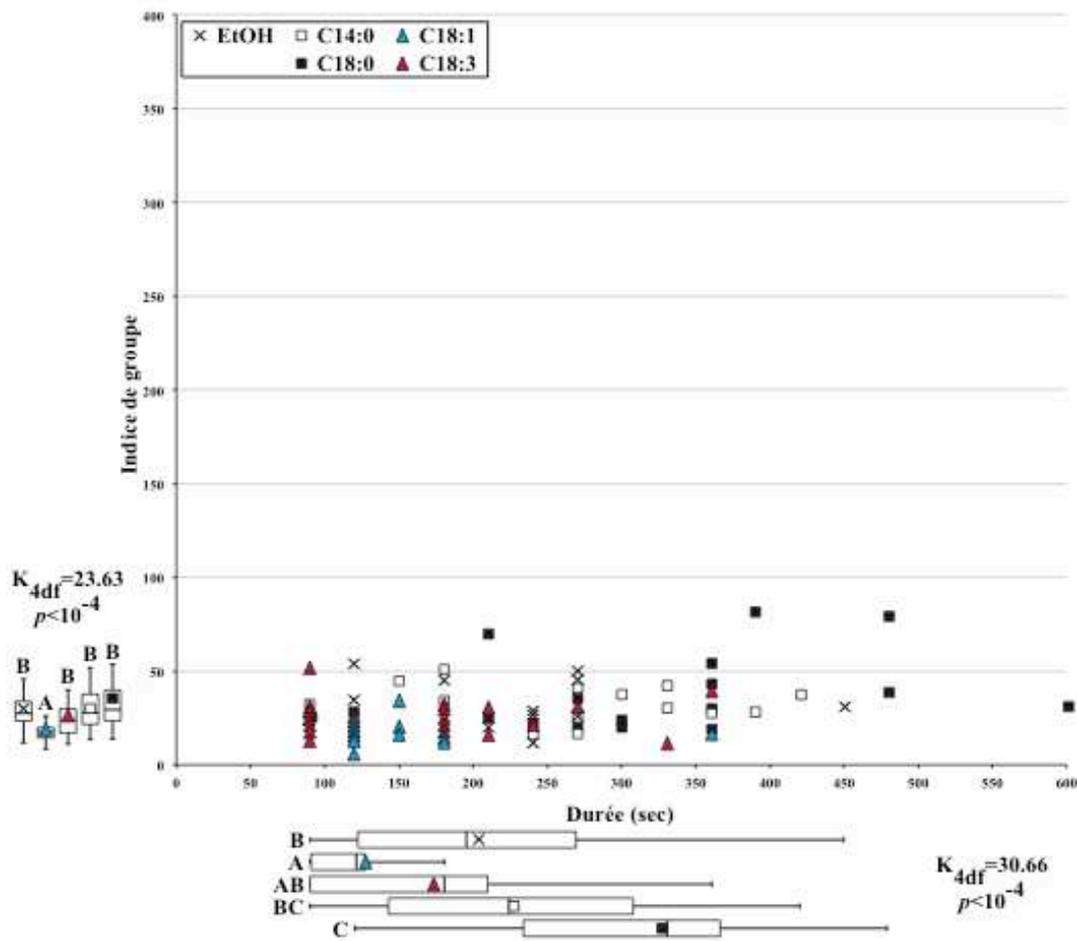


Figure A2: Indice de groupe des larves 1573 en fonction du temps (sec), selon les différents AGs testés (conc 10). En abscisse et en ordonnée sont représentées les boîtes de dispersion relatives aux différents AGs. Les lettres différentes représentent les différences statistiques significatives. Pour chaque AG et l'éthanol, n=10.

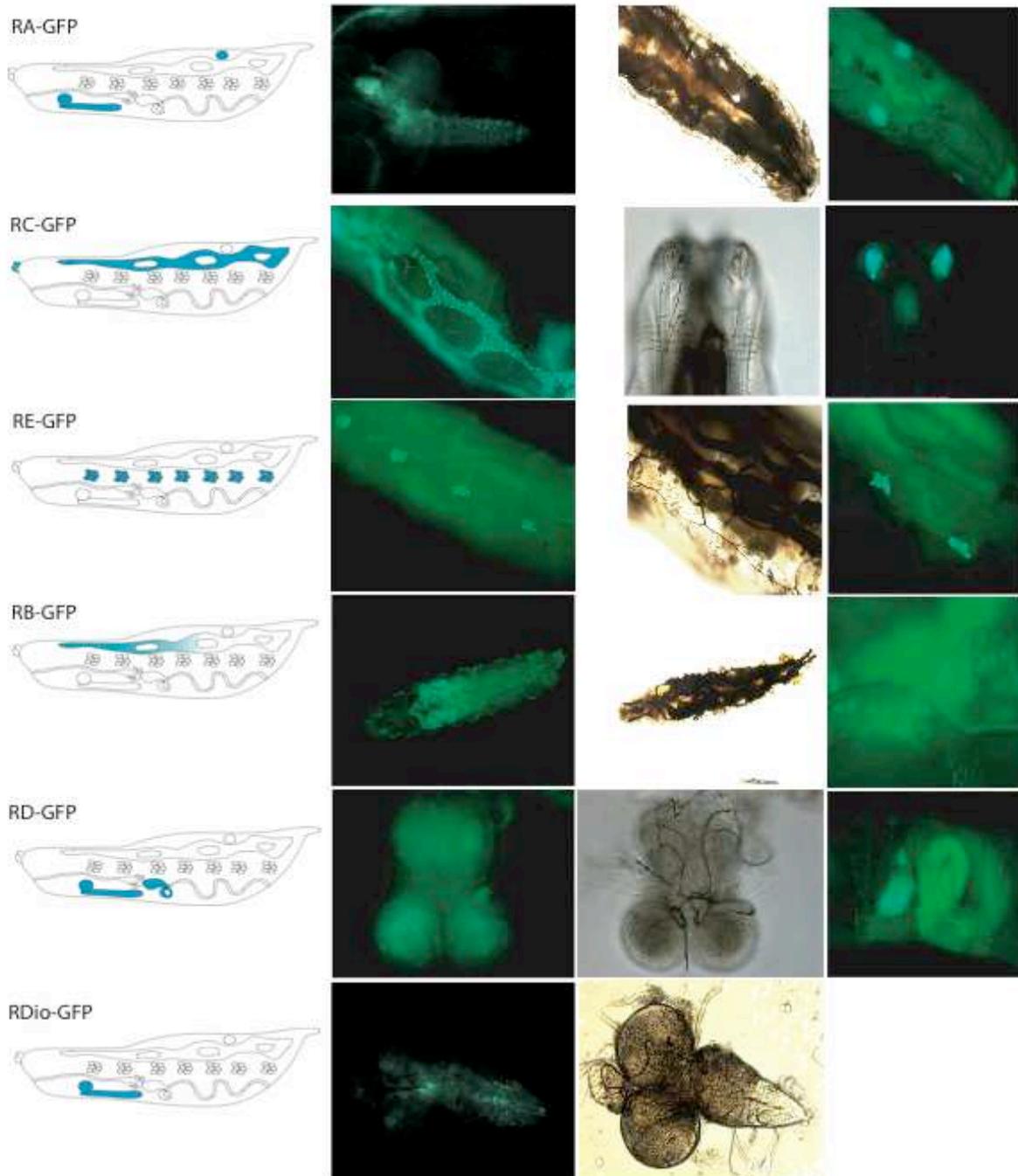


Figure A3 : Expression de Desat1 pilotée par différents promoteurs alternatifs dans la larve de *Drosophila melanogaster*. L'expression est observée grâce au système UAS-GFP. La région RA pilote l'expression de Desat1 dans le cerveau et les disques génitaux. La région RC pilote l'expression de Desat1 dans le corps gras et le DO et/ou TO. La région RE pilote l'expression de Desat1 dans les oenocytes. La région RB pilote l'expression de Desat1 dans le corps gras. La région RD pilote l'expression de Desat1 dans le cerveau et le ventricule. Enfin, la région RDio pilote l'expression de Desat1 dans le cerveau des larves. (D'après Bousquet et al. en révision).

Bibliographie

- Alloway, T. (1972) Retention of learning through metamorphosis in the grain beetle (*Tenebrio molitor*). *American Zoologist*, 12, 471-477.
- Baillie, A. G. S., C. T. Coburn & N. A. Abumrad (1996) Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *Journal of Membrane Biology*, 153, 75-81.
- Baker, K. D. & C. S. Thummel (2007) Diabetic larvae and obese flies - Emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 6, 257-266.
- Barron, A. & S. Corbert (1999) Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal Behaviour*, 58, 621-628.
- Barrozo, R. B. & C. R. Lazzari (2004) Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: Synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses*, 29, 833-841.
- Bartelt, R. J., A. M. Schaner & L. L. Jackson (1985) Cis-vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1747-1756.
- Benton, R., S. Sachse, S. W. Michnick & L. B. Vosshall (2006) Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *Plos Biology*, 4, 240-257.
- Benton, R., K. S. Vannice & L. B. Vosshall (2007) An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450, 289-U13.
- Birse, R. T., J. Choi, K. Reardon, J. Rodriguez, S. Graham, S. Diop, K. Ocorr, R. Bodmer & S. Oldham (2010) High-Fat-Diet-Induced Obesity and Heart Dysfunction Are Regulated by the TOR Pathway in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 12, 533-544.
- Bosch, O. J., M. Geier & J. Boeckh (2000) Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chemical Senses*, 25, 323-330.
- Bousquet, F., T. Nojima, B. Houot, I. Chauvel, S. Chaudy, S. Dupas, D. Yamamoto & F. JF. *desat1* expression in neural and non-neural tissues separately affects perception and emission of sex pheromones in *Drosophila soumis*, *en révision*.
- Bray, S. & H. Amrein (2003) A putative *Drosophila* pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship. *Neuron*, 39, 1019-1029.
- Bredendiek, N., J. Hutte, A. Steingraber, H. Hatt, G. Gisselmann & E. M. Neuhaus (2011) Go alpha Is Involved in Sugar Perception in *Drosophila*. *Chemical Senses*, 36, 69-81.
- Brennan, P. A. & F. Zufall (2006) Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 444, 308-315.
- Briscoe, C. P., M. Tadayyon, J. L. Andrews, W. G. Benson, J. K. Chambers, M. M. Eilert, C. Ellis, N. A. Elshourbagy, A. S. Goetz, D. T. Minnick, P. R. Murdock, H. R. Sauls, U. Shabon, L. D. Spinage, J. C. Strum, P. G. Szekeres, K. B. Tan, J. M. Way, D. M. Ignar, S. Wilson & A. I. Muir (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 11303-11311.
- Brown, A. J., S. M. Goldsworthy, A. A. Barnes, M. M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A. I. Muir, M. J. Wigglesworth, I. Kinghorn, N. J. Fraser, N. B. Pike, J. C. Strum, K. M. Steplewski, P. R. Murdock, J. C. Holder, F. H. Marshall, P. G. Szekeres, S. Wilson, D.

- M. Ignar, S. M. Foord, A. Wise & S. J. Dowell (2003) The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 11312-11319.
- Buck, L. & R. Axel (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors - a molecular-basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175-187.
- Calder, P. C. & R. F. Grimble (2002) Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, S14-S19.
- Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya & S. Damak (2010) Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by GPR40 and GPR120. *Journal of Neuroscience*, 30, 8376-8382.
- Chale-Rush, A., J. R. Burgess & R. D. Mattes (2007) Evidence for human orosensory (taste ?) sensitivity to free fatty acids. *Chemical Senses*, 32, 423-431.
- Chandrashekar, J., K. L. Mueller, M. A. Hoon, E. Adler, L. X. Feng, W. Guo, C. S. Zuker & N. J. P. Ryba (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100, 703-711.
- Chandrashekar, J., D. Yarmolinsky, L. von Buchholtz, Y. Oka, W. Sly, N. J. P. Ryba & C. S. Zuker (2009) The Taste of Carbonation. *Science*, 326, 443-445.
- Cheng, L. E., W. Song, L. L. Looger, L. Y. Jan & Y. N. Jan (2010) The Role of the TRP Channel NompC in Drosophila Larval and Adult Locomotion. *Neuron*, 67, 373-380.
- Church, R. B. & Robertso.Fw (1966) A biochemical study of growth of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 162, 337-&.
- Clyne, P. J., C. G. Warr & J. R. Carlson (2000) Candidate taste receptors in Drosophila. *Science*, 287, 1830-1834.
- Clyne, P. J., C. G. Warr, M. R. Freeman, D. Lessing, J. H. Kim & J. R. Carlson (1999) A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: Candidate odorant receptors in Drosophila. *Neuron*, 22, 327-338.
- Coccurello, R., A. Caprioli, S. Bellantuono, F. R. D'Amato, R. Conti, F. Giannessi, F. Borsini & A. Moles (2010) Effects of the increase in neuronal fatty acids availability on food intake and satiety in mice. *Psychopharmacology*, 210, 85-95.
- Colomb, J., N. Grillenzoni, A. Ramaekers & R. F. Stocker (2007) Architecture of the primary taste center of *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Comparative Neurology*, 502, 834-847.
- Couto, A., M. Alenius & B. J. Dickson (2005) Molecular, anatomical, and functional organization of the Drosophila olfactory system. *Current Biology*, 15, 1535-1547.
- Cowing, B. E. & K. E. Saker (2001) Polyunsaturated fatty acids and epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling in mammary cancer. *Journal of Nutrition*, 131, 1125-1128.
- Coyne, J. A., S. Elwyn & E. L. Rolan-Alvarez (2005) Impact of experimental design on Drosophila sexual isolation studies: Direct effects and comparison to field hybridization data. *Evolution*, 59, 2588-2601.
- Dadd, R. H. (1983) Long-chain polyenoics and the essential dietary fatty-acid requirement of the waxmoth, *Galleria-mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 29, 779-786.
- Dadd, R. H. & J. E. Kleinjan (1979) Essential fatty-acid for the mosquito *Culex pipien-arachidonic-acid*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 495-502.
- Dahanukar, A., K. Foster, W. van Naters & J. R. Carlson (2001) A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of Drosophila. *Nature Neuroscience*, 4, 1182-1186.
- Dallerac, R., C. Labeur, J. M. Jallon, D. C. Knippie, W. L. Roelofs & C. Wicker-Thomas (2000) A Delta 9 desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9449-9454.
- Debelle, J. S. & M. Heisenberg (1994) Associative odor learning in drosophila abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, 263, 692-695.
- Delay, R. J., J. C. Kinnamon & S. D. Roper (1986) Ultrastructure of mouse vallate taste-buds. 2. cell-types and cell lineage. *Journal of Comparative Neurology*, 253, 242-252.
- Derenobales, M. & G. J. Blomquist (1984) Biosynthesis of medium chain fatty-acids in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 228, 407-414.
- Derenobales, M., C. Cripps, D. W. Stanleysamuelson, R. A. Jurenka & G. J. Blomquist (1987) Biosynthesis of linoleic-acid in insects. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 364-366.
- Douglas, A. E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annual Review of Entomology*, 43, 17-37.
- Draper, H. H., D. P. Philbrick, S. Agarwal, R. Meidiger & J. P. Phillips (2000) Avid uptake of linoleic acid and vitamin E by *Drosophila melanogaster*. *Nutrition Research*, 20, 113-120.
- Dunipace, L., S. Meister, C. McNealy & H. Amrein (2001) Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Current Biology*, 11, 822-835.
- El-Yassimi, A., A. Hichami, P. Besnard & N. A. Khan (2008) Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 12949-12959.
- Faucher, C., M. Forstreuter, M. Hilker & M. de Bruyne (2006) Behavioral responses of *Drosophila* to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2739-2748.
- Figueiras, A. N. L., J. R. Girotti, S. J. Mijailovsky & M. P. Juarez (2009) Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. *Parasites & Vectors*, 2.
- Fishilevich, E., A. I. Domingos, K. Asahina, F. Naef, L. B. Vosshall & M. Louis (2005) Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, 15, 2086-2096.
- Fishilevich, E. & L. B. Vosshall (2005) Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Current Biology*, 15, 1548-1553.
- Forstner, M., T. Gohl, I. Gondesens, K. Raming, H. Breer & J. Krieger (2008) Differential expression of SNMP-1 and SNMP-2 proteins in pheromone-sensitive hairs of moths. *Chemical Senses*, 33, 291-299.
- Foster, S. P. & W. L. Roelofs (1988a) Pink-bollworm sex-pheromone biosynthesis from oleic acid. *Insect Biochemistry*, 18, 281-286.
- (1988b) Sex-pheromone biosynthesis in the leafroller moth *Planotortrix-excessana* by delta-10 desaturation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 8, 1-9.
- Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto & T. Fushiki (2003) Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiology & Behavior*, 78, 579-583.
- Gaillard, D., F. Lauguerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N. A. Khan, J. P. Montmayeur & P. Besnard (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *Faseb Journal*, 22, 1458-1468.
- Gao, Q. & A. Chess (1999) Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, 60, 31-39.
- Gao, Q., B. B. Yuan & A. Chess (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nature Neuroscience*, 3, 780-785.

- Geer, B. W. & T. J. Perille (1977) Effects of dietary sucrose and environmental-temperature on fatty-acid synthesis in *Drosophila-melanogaster*. *Insect Biochemistry*, 7, 371-379.
- Gendre, N., K. Luer, S. Friche, N. Grillenzoni, A. Ramaekers, G. M. Technau & R. F. Stocker (2004) Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development*, 131, 83-92.
- Gerstner, J. R., W. M. Vanderheyden, P. J. Shaw, C. F. Landry & J. C. P. Yin (2011) Fatty-Acid Binding Proteins Modulate Sleep and Enhance Long-Term Memory Consolidation in *Drosophila*. *Plos One*, 6.
- Gilbertson, T. A., D. T. Fontenot, L. D. Liu, H. Zhang & W. T. Monroe (1997) Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: Gustatory cues for dietary fat. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272, C1203-C1210.
- Gillies, M. T. & T. J. Wilkes (1972) Range of attraction of animal baits and carbon-dioxide for mosquitos - studies in a freshwater area of west-Africa. *Bulletin of Entomological Research*, 61, 389-&.
- Gleissman, H., J. I. Johnsen & P. Kogner (2010) Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? *Experimental Cell Research*, 316, 1365-1373.
- Gong, Z. H., E. A. Holly, F. R. Wang, J. M. Chan & P. M. Bracci (2010) Intake of fatty acids and antioxidants and pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *International Journal of Cancer*, 127, 1893-1904.
- Green, P. R. & B. W. Geer (1979) Changes in the fatty-acid composition of *Drosophila-melanogaster* during development and aging. *Archives Internationales De Physiologie De Biochimie Et De Biophysique*, 87, 485-491.
- Greenspan, R. 2009. Selection, gene interaction, and flexible gene networks. In *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*.
- Greenspan, R. J. (2001) Opinion - The flexible genome. *Nature Reviews Genetics*, 2, 383-387.
- Gutierrez, E., D. Wiggins, B. Fielding & A. P. Gould (2007) Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature*, 445, 275-280.
- Hammock, J. A., B. Vinyard & J. C. Dickens (2007) Response to host plant odors and aggregation pheromone by larvae of the Colorado potato beetle on a servosphere. *Arthropod-Plant Interactions*, 1, 27-35.
- Hashimoto, K., A. C. Yoshizawa, S. Okuda, K. Kuma, S. Goto & M. Kanehisa (2008) The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *Journal of Lipid Research*, 49, 183-191.
- Haslam, D. W. & W. P. T. James (2005) Obesity. *Lancet*, 366, 1197-1209.
- Heck, G. L., S. Mierson & J. A. Desimone (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium-transport pathway. *Science*, 223, 403-405.
- Heimbeck, G., V. Bugnon, N. Gendre, C. Haberland & R. F. Stocker (1999) Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: Toxin expression studies in chemosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 19, 6599-6609.
- Heisenberg, M., A. Borst, S. Wagner & D. Byers (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of Neurogenetics*, 2, 1-30.
- Hekmat-Safe, D. S., C. R. Safe, A. J. McKinney & M. A. Tanouye (2002) Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12, 1357-1369.
- Hildebrand, J. G. & G. M. Shepherd (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla. *Annual Review of Neuroscience*, 20, 595-631.

- Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki & G. Tsujimoto (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, 11, 90-94.
- Hiroi, M., N. Meunier, F. Marion-Poll & T. Tanimura (2004) Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 61, 333-342.
- Huang, A. L., X. K. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. J. P. Ryba & C. S. Zuker (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, 442, 934-938.
- Huang, C. B. & J. L. Ebersole (2010) A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Molecular Oral Microbiology*, 25, 75-80.
- Ito, K., W. Awano, K. Suzuki, Y. Hiromi & D. Yamamoto (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., K. Suzuki, P. Estes, M. Ramaswami, D. Yamamoto & N. J. Strausfeld (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* meigen. *Learning & Memory*, 5, 52-77.
- Jin, X., T. S. Ha & D. P. Smith (2008) SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10996-11001.
- Johnson, B. A., C. C. Woo, E. E. Hingco, K. L. Pham & M. Leon (1999) Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 409, 529-548.
- Jones, W. D., T. A. T. Nguyen, B. Kloss, K. J. Lee & L. B. Vosshall (2005) Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Current Biology*, 15, R119-R121.
- Jowett, T. & J. H. Sang (1979) Nutritional regulation of antennal-leg homoeotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 34, 143-161.
- Jumean, Z., B. O. Ma, A. M. Chubaty, C. W. Ellenor, B. D. Roitberg & G. Gries (2011) A Theoretical Approach to Study the Evolution of Aggregation Behavior by Larval Codling Moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Insect Behavior*, 24, 249-263.
- Jurenka, R. A., M. Derenobales & G. J. Blomquist (1987) Denovo biosynthesis of polyunsaturated fatty-acids in the cockroach *Periplaneta americana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255, 184-193.
- Kadohisa, M., J. V. Verhagen & E. T. Rolls (2005) The primate amygdala: Neuronal representations of the viscosity, fat texture, temperature, grittiness and taste of foods. *Neuroscience*, 132, 33-48.
- Katsoulis, E., J. G. Mabley, M. Samai, I. C. Green & P. K. Chatterjee (2009) alpha-Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *European Journal of Pharmacology*, 623, 107-112.
- Kernan, M., D. Cowan & C. Zuker (1994) Genetic dissection of mechanosensory transduction - mechanoreception-defective mutations of *drosophila*. *Neuron*, 12, 1195-1206.
- Kim, Y., H. Koepfer & L. Ehrman (1996) Developmental isolation and subsequent adult behavior of *Drosophila paulistorum*. II. prior experience. *Behavior Genetics*, 26, 15-25.
- Kim, Y., D. Phillips, T. Chao & L. Ehrman (2004) Developmental isolation and subsequent adult behavior of *Drosophila paulistorum*. VI. Quantitative variation in cuticular hydrocarbons. *Behavior Genetics*, 34, 385-394.

- Kinnamon, J. C., D. M. Henzler & S. M. Royer (1993) HVEM ultrastructural analysis of mouse fungiform taste-buds, cell-types, and associated synapses. *Microscopy Research and Technique*, 26, 142-156.
- Knols, B. G. J. & R. DeJong (1996) Limburger cheese as an attractant for the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ss. *Parasitology Today*, 12, 159-161.
- Kohler, K., E. Brunner, X. L. Guan, K. Boucke, U. F. Greber, S. Mohanty, J. M. I. Barth, M. R. Wenk & E. Hafen (2009) A combined proteomic and genetic analysis identifies a role for the lipid desaturase *Desat1* in starvation-induced autophagy in *Drosophila*. *Autophagy*, 5, 980-990.
- Kreher, S. A., J. Y. Kwon & J. R. Carlson (2005) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron*, 46, 445-456.
- Krieger, J., O. Klink, C. Mohl, K. Raming & H. Breer (2003) A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 189, 519-526.
- Kumar, M. V., T. Shimokawa, T. R. Nagy & M. D. Lane (2002) Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 1921-1925.
- Kung, C. (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*, 436, 647-654.
- Kunte, A. S., K. A. Matthews & R. B. Rawson (2006) Fatty acid auxotrophy in *Drosophila* larvae lacking SREBP. *Cell Metabolism*, 3, 439-448.
- Lacaille, F., C. Everaerts & J. F. Ferveur (2009) Feminization and Alteration of *Drosophila* Taste Neurons Induce Reciprocal Effects on Male Avoidance Behavior. *Behavior Genetics*, 39, 554-563.
- Lacaille, F., M. Hiroi, R. Twele, T. Inoshita, D. Umemoto, G. Maniere, F. Marion-Poll, M. Osaki, W. Francke, M. Cobb, C. Everaerts, T. Tanimura & J. Ferveur (2007) An inhibitory sex pheromone tastes bitter for *Drosophila* males. *PLOS ONE*, 2.
- Lacey, E. S., J. G. Millar, J. A. Moreira & L. M. Hanks (2009) Male-Produced Aggregation Pheromones of the Cerambycid Beetles *Xylotrechus colonus* and *Sarosestes fulminans*. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 733-740.
- Lacher, V. (1967) Elektrophysiologische untersuchungen an einzelnen geruchsrezeptoren auf den antennen weiblicher moskitos (*Aedes Aegypti* L). *Journal of Insect Physiology*, 13, 1461-&.
- Larsenrapport, E. (1986) Fatty-acid composition of wild-type and mutant *drosophila*. *Insect Biochemistry*, 16, 653-657.
- Larsson, M. C., A. I. Domingos, W. D. Jones, M. E. Chiappe, H. Amrein & L. B. Vosshall (2004a) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43, 703-714.
- Larsson, S. C., M. Kumlin, M. Ingelman-Sundberg & A. Wolk (2004b) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 935-945.
- Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur & P. Besnard (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 3177-3184.
- Le Poul, E., C. Loison, S. Struyf, J. Y. Springael, V. Lannoy, M. E. Decobecq, S. Brezillon, V. Dupriez, G. Vassart, J. Van Damme, M. Parmentier & M. Detheux (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25481-25489.

- Li, X. D., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller & E. Adler (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4692-4696.
- Lin, H. H., J. S. Y. Lai, A. L. Chin, Y. C. Chen & A. S. Chiang (2007) A map of olfactory representation in the Drosophila mushroom body. *Cell*, 128, 1205-1217.
- Lindemann, B. (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413, 219-225.
- Lindsay, S. W., J. H. Adiamah, J. E. Miller, R. J. Pleass & J. R. M. Armstrong (1993) Variation in attractiveness of human-subjects to malaria mosquitos (diptera, culicidae) in the Gambia. *Journal of Medical Entomology*, 30, 368-373.
- Liu, P., B. P. Shah, S. Croasdell & T. A. Gilbertson (2011) Transient Receptor Potential Channel Type M5 Is Essential for Fat Taste. *Journal of Neuroscience*, 31, 8634-8642.
- Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, G. L. Frehywot, C. A. Townsend, G. V. Ronnett, M. D. Lane & F. P. Kuhajda (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288, 2379-2381.
- Malnic, B., J. Hirono, T. Sato & L. B. Buck (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96, 713-723.
- Marcillac, F., F. Bousquet, J. Alabouvette, F. Savarit & J. F. Ferveur (2005a) A mutation with major effects on Drosophila melanogaster sex pheromones. *Genetics*, 171, 1617-1628.
- Marcillac, F., Y. Grosjean & J. F. Ferveur (2005b) A single mutation alters production and discrimination of Drosophila sex pheromones. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 303-309.
- Marella, S., W. Fischler, P. Kong, S. Asgarian, E. Rueckert & K. Scott (2006) Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior. *Neuron*, 49, 285-295.
- Marin, E. C., G. Jefferis, T. Komiyama, H. T. Zhu & L. Q. Luo (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the Drosophila brain. *Cell*, 109, 243-255.
- Marin, E. C., R. J. Watts, N. K. Tanaka, K. Ito & L. Q. Luo (2005) Developmentally programmed remodeling of the Drosophila olfactory circuit. *Development*, 132, 725-737.
- Marsollier, N., C. Cansell, L. Penicaud, C. Magnan & C. Cruciani-Guglielmacci (2008) Central free fatty acid sensing decreases food intake and induces insulin resistance after fasting. *Diabetes*, 57, A84-A84.
- Masuda-Nakagawa, L. M., N. Gendre, C. J. O'Kane & R. F. Stocker (2009) Localized olfactory representation in mushroom bodies of Drosophila larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 10314-10319.
- Masuda-Nakagawa, L. M., N. K. Tanaka & C. J. O'Kane (2005) Stereotypic and random patterns of connectivity in the larval mushroom body calyx of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 19027-19032.
- Melcher, C. & M. J. Pankratz (2005) Candidate gustatory Interneurons modulating feeding behavior in the Drosophila brain. *Plos Biology*, 3, 1618-1629.
- Melo, A. C. A., M. Rutzler, R. J. Pitts & L. J. Zwiebel (2004) Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chemical Senses*, 29, 403-410.
- Meunier, N., J. F. Ferveur & F. Marion-Poll (2000) Sex-specific non-pheromonal taste receptors in Drosophila. *Current Biology*, 10, 1583-1586.
- Meyerhof, W., M. Behrens, A. Brockhoff, B. Bufe & C. Kuhn (2005) Human bitter taste perception. *Chemical Senses*, 30, I14-I15.

- Mitchell, B. K. & H. Itagaki (1992) Interneurons of the subesophageal ganglion of *Sarcophaga bullata* responding to gustatory and mechanosensory stimuli. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 171, 213-230.
- Mullens, B. A., W. G. Reifenrath & S. M. Butler (2009) Laboratory trials of fatty acids as repellents or antifeedants against houseflies, horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 65, 1360-1366.
- Murff, H. J., X. O. Shu, H. L. Li, G. Yang, X. Y. Wu, H. Cai, W. Q. Wen, Y. T. Gao & W. Zheng (2011) Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 128, 1434-1441.
- Narise, S. & T. Narise (1991) Chemical communication of emigration behavior of *Drosophila melanogaster*. 2. identification of chemical substances. *Japanese Journal of Genetics*, 66, 411-420.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh revised edition. National Academy Press: Washington. 381p.*
- Nayak, S. V. & R. N. Singh (1983) Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster* meigen (Diptera, drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 12, 273-291.
- (1985) Primary sensory projections from the labella to the brain of *Drosophila melanogaster* meigen (Diptera, drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 14, 115-129.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. X. Feng, G. Zhao, N. J. P. Ryba & C. S. Zuker (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416, 199-202.
- Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. F. Zhang, N. J. P. Ryba & C. S. Zuker (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381-390.
- Neuhaus, E. M., G. Gisselmann, W. Y. Zhang, R. Dooley, K. Stortkuhl & H. Hatt (2005) Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience*, 8, 15-17.
- Nichols, Z. & R. G. Vogt (2008) The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D-pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 398-415.
- Okada, R., T. Awasaki & K. Ito (2009) Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)-Mediated Neural Connections in the *Drosophila* Antennal Lobe. *Journal of Comparative Neurology*, 514, 74-91.
- Oppliger, F. Y., P. M. Guerin & M. Vlimant (2000) Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 46, 135-144.
- Osterkamp, J., U. Wahl, G. Schmalfluss & W. Haas (1999) Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 185, 59-67.
- Park, S. K., K. J. Mann, H. Lin, E. Starostina, A. Kolski-Andreaco & C. W. Pikielny (2006) A *Drosophila* protein specific to pheromone-sensing gustatory hairs delays males' copulation attempts. *Current Biology*, 16, 1154-1159.
- Pitts, R. J., A. N. Fox & L. J. Zwiebel (2004) A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5058-5063.

- Python, F. & R. F. Stocker (2002) Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *Drosophila melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 445, 374-387.
- Qiu, Y. T., J. J. A. van Loon, W. Takken, J. Meijerink & H. M. Smid (2006) Olfactory coding in antennal neurons of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chemical Senses*, 31, 845-863.
- Ramaekers, A., E. Magnenat, E. C. Marin, N. Gendre, G. Jefferis, L. Q. Luo & R. F. Stocker (2005) Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Current Biology*, 15, 982-992.
- Rapport, E. W., D. Stanleysamuelson & R. H. Dadd (1984) 10 generations of *Drosophila melanogaster* reared axenically on a fatty-acid-free holidic diet. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1, 243-250.
- Raubenheimer, D. & S. J. Simpson (1999) Integrating nutrition: a geometrical approach. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 91, 67-82.
- Rezaval, C., S. Werbach & M. F. Ceriani (2007) Neuronal death in *Drosophila* triggered by GAL4 accumulation. *European Journal of Neuroscience*, 25, 683-694.
- Robertson, H. M., C. G. Warr & J. R. Carlson (2003) Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 14537-14542.
- Robinow, S. & K. White (1988) The locus *Elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Developmental Biology*, 126, 294-303.
- (1991) Characterization and spatial-distribution of the *Elav* protein during *Drosophila melanogaster* development. *Journal of Neurobiology*, 22, 443-461.
- Rodrigues, V. & O. Siddiqi (1981) A gustatory mutant of *Drosophila* defective in pyranose receptors. *Molecular & General Genetics*, 181, 406-408.
- Rogers, M. E., M. Sun, M. R. Lerner & R. G. Vogt (1997) *Snmp-1*, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14792-14799.
- Rohlf, M. & T. S. Hoffmeister (2003) An evolutionary explanation of the aggregation model of species coexistence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, S33-S35.
- Rolls, E. T., M. L. Kringelbach & I. E. T. de Araujo (2003) Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. *European Journal of Neuroscience*, 18, 695-703.
- Root, C. M., K. I. Ko, A. Jafari & J. W. Wang (2011) Presynaptic Facilitation by Neuropeptide Signaling Mediates Odor-Driven Food Search. *Cell*, 145, 133-144.
- Saitou, K., T. Yoneda, T. Mizushige, H. Asano, M. Okamura, S. Matsumura, A. Eguchi, Y. Manabe, S. Tsuzuki, K. Inoue & T. Fushiki (2009) Contribution of gustation to the palatability of linoleic acid. *Physiology & Behavior*, 96, 142-148.
- Sato, K., M. Pellegrino, T. Nakagawa, L. B. Vosshall & K. Touhara (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452, 1002-U9.
- Scott, K., R. Brady, A. Cravchik, P. Morozov, A. Rzhetsky, C. Zuker & R. Axel (2001) A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 104, 661-673.
- Shanbhag, S. R., B. Muller & R. A. Steinbrecht (1999) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* - 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *International Journal of Insect Morphology & Embryology*, 28, 377-397.

- Shang, Y. H., A. Claridge-Chang, L. Sjulson, M. Pypaert & G. Miesenbock (2007) Excitatory local circuits and their implications for olfactory processing in the fly antennal lobe. *Cell*, 128, 601-612.
- Simpson, S. J. & D. Raubenheimer (2005) Obesity: the protein leverage hypothesis. *Obesity Reviews*, 6, 133-142.
- Smallegange, R. C., Y. T. Qiu, G. Bukovinszky-Kiss, J. J. A. Van Loon & W. Takken (2009) The Effect of Aliphatic Carboxylic Acids on Olfaction-Based Host-Seeking of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 933-943.
- Stark, W. S., T. N. Lin, D. Brackhahn, J. S. Christianson & G. Y. Sun (1993) Fatty-acids in the lipids of drosophila heads-effects of visual mutants, carotenoid deprivation and dietary fatty-acids. *Lipids*, 28, 345-350.
- Starostina, E., A. G. Xu, H. P. Lin & C. W. Pikielny (2009) A Drosophila Protein Family Implicated in Pheromone Perception Is Related to Tay-Sachs GM2-Activator Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 585-594.
- Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset & R. S. J. Keast (2011) Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity. *Progress in Lipid Research*, 50, 225-233.
- Stocker, R. F. (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*-a review. *Cell and Tissue Research*, 275, 3-26.
- Strausfeld, N. J. & J. G. Hildebrand (1999) Olfactory systems: common design, uncommon origins? *Current Opinion in Neurobiology*, 9, 634-639.
- Suh, G. S. B., A. M. Wong, A. C. Hergarden, J. W. Wang, A. F. Simon, S. Benzer, R. Axel & D. J. Anderson (2004) A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature*, 431, 854-859.
- Svetec, N. & J. F. Ferveur (2005) Social experience and pheromonal perception can change male-male interactions in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 208, 891-898.
- Symonds, M. R. E. & M. A. Elgar (2004) The mode of pheromone evolution: evidence from bark beetles. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, 839-846.
- Technau, G. & M. Heisenberg (1982) Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 295, 405-407.
- Thorne, N., C. Chromey, S. Bray & H. Amrein (2004) Taste perception and coding in *Drosophila*. *Current Biology*, 14, 1065-1079.
- Thorpe, W. H. (1939) Further studies on pre-imaginal olfactory conditioning in insects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 127, 424-433.
- Tinette, S., L. Zhang & A. Robichon (2004) Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior. *Genes Brain and Behavior*, 3, 39-50.
- Tobin, P. C., L. Berec & A. M. Liebhold (2011) Exploiting Allee effects for managing biological invasions. *Ecology Letters*, 14, 615-624.
- Troemel, E. R., J. H. Chou, N. D. Dwyer, H. A. Colbert & C. I. Bargmann (1995) Divergent 7 transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C-elegans*. *Cell*, 83, 207-218.
- Tsuruta, M., T. Kawada, T. Fukuwatari & T. Fushiki (1999) The olfactory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiology & Behavior*, 66, 285-288.
- Tully, T., V. Cambiaso & L. Kruse (1994) Memory through metamorphosis in mutant and normal *Drosophila*. *Journal of Neurosciences*, 14, 68-74.

- Ueno, K., M. Ohta, H. Morita, Y. Mikuni, S. Nakajima, K. Yamamoto & K. Isono (2001) Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene Gr5a. *Current Biology*, 11, 1451-1455.
- Ueyama, M., T. Chertemps, C. Labeur & C. Wicker-Thomas (2005) Mutations in the *desat1* gene reduces the production of courtship stimulatory pheromones through a marked effect on fatty acids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 911-920.
- van Naters, W. V. & J. R. Carlson (2006) Insects as chemosensors of humans and crops. *Nature*, 444, 302-307.
- Vogt, R. G., N. E. Miller, R. Litvack, R. A. Fandino, J. Sparks, J. Staples, R. Friedman & J. C. Dickens (2009) The insect SNMP gene family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 448-456.
- Vosshall, L. B., H. Amrein, P. S. Morozov, A. Rzhetsky & R. Axel (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96, 725-736.
- Vosshall, L. B. & B. S. Hansson (2011) A Unified Nomenclature System for the Insect Olfactory Coreceptor. *Chemical Senses*, 36, 497-498.
- Vosshall, L. B. & R. E. Stocker (2007) Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 505-533.
- Vosshall, L. B., A. M. Wong & R. Axel (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102, 147-159.
- Wang, Z. R., A. Singhvi, P. Kong & K. Scott (2004) Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell*, 117, 981-991.
- Wertheim, B., J. Marchais, L. E. M. Vet & M. Dicke (2002) Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecological Entomology*, 27, 608-617.
- Wicker-Thomas, C., C. Henriot & R. Dallerac (1997) Partial characterization of a fatty acid desaturase gene in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 963-972.
- Wilson, R. I. & G. Laurent (2005) Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *Journal of Neuroscience*, 25, 9069-9079.
- Wistrand, M., L. Kall & E. L. L. Sonnhhammer (2006) A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs. *Protein Science*, 15, 509-521.
- Wong, A. M., J. W. Wang & R. Axel (2002) Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell*, 109, 229-241.
- Xu, A., S. K. Park, S. D'Mello, E. Kim, Q. Wang & C. W. Pikielny (2002) Novel genes expressed in subsets of chemosensory sensilla on the front legs of male *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*, 307, 381-392.
- Yang, C. H., P. Belawat, E. Hafen, L. Y. Jan & Y. N. Jan (2008) *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science*, 319, 1679-1683.
- Yarmolinsky, D. A., C. S. Zuker & N. J. P. Ryba (2009) Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell*, 139, 234-244.
- Yehuda, S., S. Rabinovitz-Shenkar & R. Carasso (2011) Effects of essential fatty acids in iron deficient and sleep-disturbed attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) children. *Eur J Clin Nutr*.
- Yoneda, T., K. Saitou, T. Mizushige, S. Matsumura, Y. Manabe, S. Tsuzuki, K. Inoue & T. Fushiki (2007) The palatability of corn oil and linoleic acid to mice as measured by short-term two-bottle choice and licking tests. *Physiology & Behavior*, 91, 304-309.

- Yu, T., B. Shah, D. Hansen & T. Gilbertson. 2007. Fatty acid responses in rat trigeminal neurons-textural cues for dietary fat. In *Keystone Symposia*. Snowbird UT.
- Zeng, X. N., J. J. Leyden, H. J. Lawley, K. Sawano, I. Nohara & G. Preti (1991) Analysis of characteristic odors from human male axillae. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1469-1492.
- Zhao, G. Q., Y. F. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. P. Ryba & C. S. Zuker (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115, 255-266.
- Zhao, G. X., T. D. Etherton, K. R. Martin, J. P. V. Heuvel, P. J. Gillies, S. G. West & P. M. Kris-Etherton (2005) Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336, 909-917.

Résumé

Les acides gras (AGs) sont des molécules nécessaires pour la survie des êtres vivants car ils participent à de nombreuses voies métaboliques et constituent un réservoir énergétique important. Malgré le lien établi entre les AGs et certaines maladies humaines (cancers, obésité, maladies cardiovasculaires), les mécanismes sous-jacents à la perception de ces composés ont été, jusqu'à présent, très peu explorés, en particulier chez les invertébrés. C'est l'une des raisons pour lesquelles, nous avons étudié, lors de notre thèse, la perception des AGs à longue chaîne (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3), en utilisant l'espèce modèle *Drosophila melanogaster*. Nous avons aussi tenté de caractériser quelques facteurs biologiques sous-jacents à la modulation de cette réponse.

Nos observations comportementales, effectuées sur des individus ou des groupes issus des deux lignées sauvages Dijon2000 (Di2) et Canton-S, ont permis de démontrer que les larves étaient capables de distinguer ces AGs. En particulier, nous avons observé que les larves sont attirées par les AGs insaturés et fortement repoussées et/ou stressés par les AGs saturés. Ces derniers déclenchent d'ailleurs une forte réaction comportementale chez les groupes de larves qui montrent un phénomène durable d'agrégation.

Une autre raison pour effectuer cette étude vient de la proximité structurale des AGs et des hydrocarbures cuticulaires qui servent de phéromones sexuelles chez les adultes. Ainsi, nous avons testé la réponse de mutants pour les gènes *desat1* et *CheB42a*, qui sont impliqués dans la perception et/ou la discrimination de ces phéromones. Les larves mutantes *desat1* ne montrent pas de comportement d'agrégation, ce qui suggère une altération de leur perception ou de leur réaction sur les AGs saturés. Nous avons ciblé des perturbations de *desat1* dans divers tissus en combinant différentes lignées pilotes (correspondant aux différentes régions régulatrices de *desat1*) avec un transgène exprimant l'ARN interférent de *desat1*. Nous avons découvert qu'une région régulatrice ciblant l'ARN interférent dans une partie du cerveau perturbe la réponse aux AGs saturés, ce qui est cohérent avec le résultat précédent. Les larves portant le transgène *CheB42a-Gal4* montrent des défauts plus subtils et néanmoins une répulsion moins forte vis-à-vis des AGs saturés.

Nous avons tiré profit du temps court de génération de la drosophile pour réaliser deux expériences de sélection sur la lignée Di2, pendant environ 50 générations. Dans un premier temps, nous avons sélectionné, génération après génération, les larves montrant des réponses atténuées envers le C18:0, et nous avons observé, après 20 générations, une plus faible tendance à éviter cet AG. Dans un deuxième temps, nous avons élevé la lignée Di2 sur un milieu appauvri en AGs et nous avons noté que les larves ainsi élevées perçoivent anormalement le C18:3.

Afin de vérifier si la préférence envers les AGs pouvait changer au cours de la vie, nous avons testé la réponse des adultes. Un test réalisé dans un olfactomètre, et visant à mesurer la réponse olfactive, montre que les adultes sont repoussés par le C18:3, et indifférents au C18:0. Un test de réponse gustative (répression de l'extension du proboscis) montre que les AGs insaturés répriment plus fortement la réponse que les AGs saturés.

En conclusion, au cours de notre thèse, nous avons pu démontrer que les préférences envers les AGs saturés et insaturés varient au cours de la vie de la drosophile, peut-être en relation avec leurs besoins nutritifs. Les AGs semblent être perçus par olfaction, gustation, et peut être par mécanosensation.

Abstract

Fatty-acids (FAs) are crucial for animal survival and reproduction since these molecules are involved in many metabolic pathways and constitute a substantial store of energy. Despite the strong relationship established between excessive FA consumption and severe human etiologies (obesity, cancer, vascular diseases), our knowledge of the mechanisms underlying FA perception and preference is limited particularly in invertebrates. This is one of the reasons why we decided to investigate, during our PhD thesis, the perception of long-chain FAs (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3), using the model species *Drosophila melanogaster*. We have also attempted to characterize some of the biological factors involved in the modulation of this response.

Our behavioral tests, carried both on individuals and groups of the two wild-type strains Dijon2000 (Di2) and Canton-S, revealed that larvae are able to distinguish these FAs. More precisely, we observed that larvae are attracted by unsaturated FAs and strongly repulsed and/or stressed by saturated FAs. The latter compounds also induce a strong behavioral reaction in groups of larvae resulting into a long-lasting aggregation figure.

Another reason to study FAs is their structural proximity with cuticular hydrocarbons which act as sex pheromones in adults. Therefore, we measured the behavioral response of mutants for the *desat1* and *CheB42a* genes, both of which are involved in the perception and/or discrimination of these pheromones. The fact that mutant *desat1* larvae do not show aggregation behavior suggests that they have an abnormal perception or reaction to saturated FAs. We then targeted genetic alteration of *desat1* using drivers (made with different regulatory regions of *desat1*) combined with a transgene carrying the interferential RNA of *desat1*. When targeting a specific brain region, we found that larvae do not properly react to C18:0. This result is coherent with the defect described above. On the other hand, larvae carrying the *CheB42a-Gal4* transgene exhibit more subtle defects including a slightly altered reaction to saturated FAs.

We also took advantage of the short generation time of *D. melanogaster* to perform two selection experiments using the parental Di2 strain during 50 generations. First, we selected, generation after generation, larvae showing decreased aversive response to C18:0, and we observed, after 20 generations, a weaker tendency to avoid this FA. Second, we maintained the Di2 strain on a food with a poor FA content, and we noted that resulting larvae show an altered response to C18:3.

To check whether FA preference could change during life time, we also measured adult behavior. A first test performed in an olfactometer to assess olfactory response, revealed that flies are repulsed by C18:3, but are indifferent to C18:0. A second test assessing adult gustatory response (with the repression of the proboscis extension reflex) showed that unsaturated FAs repress behavior more strongly than saturated FAs.

In summary, during our PhD thesis, we have shown that FA preference can change during the life of *D. melanogaster*, maybe in relation with different nutritional requirements. FAs seem to be perceived by olfaction, taste and maybe mechanosensation.