



**HAL**  
open science

# Rôle du transporteur d'acides aminés Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux chez *Drosophila melanogaster*

Mégane Simonnet

► **To cite this version:**

Mégane Simonnet. Rôle du transporteur d'acides aminés Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux chez *Drosophila melanogaster*. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS046 . tel-01280257v2

**HAL Id: tel-01280257**

**<https://theses.hal.science/tel-01280257v2>**

Submitted on 4 Mar 2016

**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.

**UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ**

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

UMR 6265 CNRS – 1324 INRA – UBFC

*Équipe 14 « Perception Sensorielle, Interactions Glie/Neurones »*

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté**

Discipline : Sciences de la Vie - Spécialité : Biochimie et Neurobiologie

Présentée et soutenue le 17 Décembre 2015

Par

**Mégane SIMONNET**

---

**Rôle du transporteur d'acides aminés Minidiscs  
dans le fonctionnement du système nerveux chez  
*Drosophila melanogaster***

---

**Composition du Jury :**

---

**Laurent SEUGNET** (CR-HDR, INSERM CRNL, Lyon)

**Rapporteur**

**Serge BIRMAN** (DR, CNRS ESPCI, Paris)

**Rapporteur**

**Jean-René MARTIN** (DR, CNRS N&D, Paris)

**Examineur**

**Guillaume ISABEL** (MCU-CE, UPS CRCA, Toulouse)

**Examineur**

**Corinne LELOUP** (Pr, UBFC CSGA, Dijon)

**Présidente du Jury**

**Yaël GROSJEAN** (CR-HDR, CNRS CSGA, Dijon)

**Directeur de thèse**

**Gérard MANIÈRE** (MCU, UBFC CSGA, Dijon)

**Co-encadrant**



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Laurent Seugnet, Serge Birman, Jean-René Martin, Guillaume Isabel et Corinne Leloup pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.*

*Je voudrais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Jean-René Martin et Jean-Philippe Charles pour leurs conseils lors de ces rendez-vous annuels.*

*Je souhaite aussi exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Yaël Grosjean et mon co-encadrant, Gérard Manière. Merci de m'avoir soutenue lors des différentes étapes de ma thèse et lors de sa rédaction. Votre implication, votre enthousiasme et votre réactivité (parfois plus que surprenante, à croire que je n'étais pas toute seule à bosser la nuit), ont rendu cette période de rédaction moins atroce que je ne l'avais imaginée !*

*Yaël, c'est ton optimisme à (vraiment) toutes épreuves qui m'aura marquée... et ta capacité à le retransmettre quand tout a l'air de partir en vrille. Merci aussi pour les séances de coaching anti-craquage, puis pour ta confiance infaillible en ta thésarde. Je te remercie aussi pour ton ouverture d'esprit et ta façon de guider sans imposer qui, de discussion en discussion, m'ont aidé à développer mon esprit critique et ont forgé ma réflexion scientifique.*

*M'sieur Manière, tu es arrivé sur cette thèse en cours de route et c'est bien dommage ! Je pense que ce projet y aurait gagné à ce que l'on confronte nos points de vue de gens bornés (mais pas tant que ça) un peu plus tôt. Mais mieux vaut tard que jamais, ça a été un plaisir de bosser avec toi et je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant ma dernière année de thèse.*

*Bref, j'ai vraiment eu de la chance de vous avoir comme chefs !!*

*Puis merci aussi à m'sieur Farine pour avoir accepté d'être mon premier directeur de thèse avant que Yaël puisse prendre officiellement la relève. Ce fut sympa d'être un peu ta thésarde !!*

*Je voudrais aussi remercier tous les autres membres de notre « Dream team », Martine, Anna, Cindy, Flore, Flora, Diego, Ana, Georges, Dehbia, José et Serge, ainsi que les membres de notre équipe voisine de drosophilistes, pour tous les bons moments passés ensemble. C'est grâce à vous tous que j'ai autant apprécié de travailler dans ce labo.*

*Cindy et Ismail, mes colocataires de bureau préférés, faire cette thèse sans vous à côté n'aurait vraiment pas eu le même charme ! Merci pour les pauses chocolat, les batailles de tubes à posters, les discussions existentielles, les dessins sur l'aquarium, les œuvres d'art en aluminium, et surtout pour toute votre joie de vivre communicative !*

*Merci Ismail (et tous les gens qui habitent dans ta tête) d'avoir traîné dans ce labo aussi tard que moi, je me suis sentie moins seule ! Tes explications détaillées sur la décapitation des lapereaux à l'aide de ciseaux et d'un lapin Lindt me laissent par contre toujours un peu perplexe ...*

*Cindy, un grand merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, autant sur le plan technique que moral ! Bosser avec toi a vraiment été super ! Avoir partagé avec toi notre bureau et notre paillasse restera un très bon souvenir...*

*Merci à Martine aussi pour ton soutien moral autant pour la thèse que pour tout un tas d'autres idées qu'on partage ! Avoir quelqu'un dans le bureau d'à côté sur qui on peut compter, ça n'a pas de prix !! J'espère qu'on ne t'a pas trop embêtée à glousser à côté...*

*Flore, tu m'as fait découvrir la culture cellulaire et je t'en remercie ! Apprendre de nouvelles techniques à tes côtés et travailler ensemble ont été des expériences scientifiques formidables !*

*Flora, ma jolie rousse, tu as été ma stagiaire préférée (je dis pas ça parce que tu as été ma seule stagiaire). Toi aussi merci pour ta bonne humeur et pour nos vagues moments d'hystérie partagés, tu as embelli mon quotidien. Bon courage pour la fin de ta thèse, tu vas tout déchirer !!*

*Thibault, ce fut un plaisir de te rencontrer dans ce labo puis d'apprendre à te connaître par la suite, tu vaux le détour ! Grâce à toi, j'ai eu l'honneur de voyager sur Chouquette, c'était génial.*

*M'sieur Dupas, nos partages de points de vue furent un plaisir, même si j'attends toujours que tu vires ta cuti alimentaires parlant pour parfaire ton sens de l'écologie. Merci pour les randonnées qui m'ont fait découvrir la Bourgogne et les after-rando chez toi ! La thématique végane gluten-free est clairement à réitérer... Puis, comme Alex, j'attends toujours qu'on aille écouter les cerfs bramer !!*

*Alex, même si tu as quitté ce labo, tu es quand même toujours un peu là !! Nos grandes discussions me manquent un peu mais je suis ravie de t'avoir rencontrée dans ce labo, tu as été mon modèle en tant que thésarde...*

*Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à tous les membres du CSGA et de l'école doctorale « environnement-santé » qui m'ont apporté leur aide au cours de cette thèse, ainsi que les membres de l'IUT Génie Biologique et de l'uB qui m'ont permis de découvrir avec plaisir les joies de l'enseignement.*

*Je voudrais également remercier tous les doctorants de l'asso EDIFICE. Organiser avec vous le forum des jeunes chercheurs et autres apéro-conférences ont été des expériences enrichissantes !*

*À tous les copains thésards (ou pas) rencontrés à la fac de Chartres, d'Orléans, d'Angers ou de Dijon, c'est à vous que je dois nombre de bons souvenirs qui ont jalonné ces huit années d'études supérieures. Merci pour les super soirées partagées mais aussi pour nos échanges sur les angoisses de la thèse, vous êtes géniaux !!*

*Une pensée particulière pour Anthony et ma n'Amoureuse. On ne s'est pas vu ou presque pendant ces trois ans de thèse et pourtant vous avez toujours été aux premières loges de tous mes déboires et toutes mes réussites (vivent les forfaits mobiles illimités). Merci infiniment d'avoir toujours été là, je vous n'aime fort !!! Bon courage pour la fin de vos thèses...*

*Merci aussi à Erwan et Delphine qui sont partis vivre dans le « tiers monde » où j'habitais avant (le Maine-et-Loire) (ah ah ! c'est le karma, ça vous apprendra à vous moquer !!). Vous m'avez presque adoptée quand je suis arrivée sur Dijon et je garde de super souvenirs de toutes ces soirées à thématiques variées passées ensemble.*

*Je voudrais aussi remercier toute ma troupe de cirque et particulièrement Odile, notre super prof en peluche sans qui cette troupe n'aurait pas existé !! Vous avez été mon moyen de décompression post-labo pendant ces trois ans de thèse ! Nos soirées feu, nos répétitions et nos spectacles sont toujours des moments magiques où le temps s'arrête... Merci d'avoir été là mes circassiens adorés, c'est aussi grâce à vous que je suis arrivée au bout de cette thèse sans craquer !!*

*Guillaume, merci à toi aussi d'avoir été là pour me soutenir tout au long de cette thèse et d'avoir supporté que je ne sois pas toujours très disponible.*

*Merci aussi à Patrick, Françoise et Paulette pour votre accueil chaleureux à mon arrivée à Dijon. J'ai trouvé, grâce à vous, une deuxième famille en arrivant de ce côté de la France.*

*Enfin, je tiens à remercier profondément mes parents, mon frangin et ma grand-mère pour leur soutien infaillible à distance. Ensemble, nous avons pu moult fois nous interroger sur le bien fondé de faire une thèse... Visiblement, comme le petit a décidé d'en commencer une cette année, il faut croire que c'est malgré tout une bonne idée !*

*Puis pour finir, j'adresse mes pensées à toutes ces drosophiles qui ont donné leur vie pour mener à bien cette thèse... même si elles n'y ont pas vraiment mis de la bonne volonté !*

# TABLE DES MATIÈRES

INDEX DES FIGURES.....	11
INDEX DES TABLEAUX .....	17
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	23
<b>Partie 1 : Les transporteurs transmembranaires d'acides aminés .....</b>	<b>25</b>
a) Les différentes classes de transporteurs transmembranaires.....	26
b) Nomenclature des gènes codant pour les transporteurs SLC.....	28
c) Les différentes familles de transporteurs d'acides aminés.....	28
c.1) Les transporteurs SLC1 .....	28
c.2) Les transporteurs SLC3 .....	29
c.3) Les transporteurs SLC6 .....	30
c.4) Les transporteurs SLC7 .....	30
c.4.1) Les transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) :.....	30
c.4.2) Les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) :.....	31
c.5) Les transporteurs SLC17 .....	35
c.6) Les transporteurs SLC25 .....	35
c.7) Les transporteurs SLC32 .....	36
c.8) Les transporteurs SLC36 .....	36
c.9) Les transporteurs SLC38 .....	37
c.10) Les transporteurs SLC43 .....	37
<b>Partie 2 : Intérêts de la drosophile pour l'étude des HAT dans le système nerveux .....</b>	<b>38</b>
a) Conformation des protéines HAT de mammifères et de drosophiles.....	39
b) Les protéines HAT identifiées chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	41
b.1) Chaîne lourde : CD98 heavy chain (CD98hc) .....	41
b.2) Chaînes légères .....	41
b.2.1) Minidiscs (Mnd) .....	41
b.2.2) Genderblind (Gb) .....	42
b.2.3) Juvenile hormone Inducible-21 (Jhl-21) .....	42
b.2.4) CG1607 et CG9413.....	43
c) Comparaison des systèmes nerveux de mammifères et de drosophiles .....	43
c.1) Les neurones.....	44
c.2) Les cellules gliales.....	46



<b>Partie 3 : Intégration des informations par le système nerveux de drosophile et réponse comportementale.....</b>	<b>48</b>
a) La perception sensorielle olfactive .....	48
b) L'apprentissage et la mémoire olfactive.....	51
c) Le comportement locomoteur .....	55
<b>Partie 4 : Objectifs de la thèse .....</b>	<b>57</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>61</b>
<b>Partie 1 : Souches de drosophiles utilisées et création de nouvelles lignées.....</b>	<b>63</b>
a) Élevage des drosophiles.....	63
b) Lignée choisie comme référence .....	63
c) Le système Gal4-UAS.....	63
d) Lignées Gal4 issues de Bloomington.....	64
e) Création de lignées Gal4 à partir de séquences régulatrices de <i>minidiscs</i> .....	64
e.1) Amplification de différents fragments de <i>minidiscs</i> par PCR.....	64
e.2) Clonage et transformation bactérienne .....	67
e.3) Extraction d'ADN plasmidique et sous-clonage.....	67
e.4) Intégration au génome de drosophile.....	69
f) Lignées UAS provenant de Bloomington et du VDRC .....	69
g) Principe de l'interférence par ARN.....	70
h) Création de la lignée UAS- <i>minidiscs</i> .....	71
h.1) Amplification de l'ADNc de <i>minidiscs</i> par PCR, clonage et sous-clonage.....	71
h.2) Intégration au génome de drosophile.....	72
i) Lignées et procédure utilisées pour la délétion de <i>minidiscs</i> .....	73
<b>Partie 2 : Lignée cellulaire utilisée et création d'outils génétiques.....</b>	<b>74</b>
a) Conditions de culture des cellules S2 de drosophiles .....	74
b) Création d'ARN double brins et méthodes de transfection.....	75
b.1) Synthèse d'ARN double brins .....	75
b.2) Méthodes de transfection .....	76
c) Création de vecteurs pour la sur-expression de protéines et méthode de transfection .....	77
c.1) Vecteur pour la sur-expression de <i>minidiscs</i> .....	77
c.2) Vecteur pour la sur-expression de protéines taguées.....	78
c.3) Méthode de transfection .....	81
<b>Partie 3 : Étude génomique et transcriptionnelle .....</b>	<b>82</b>
a) Extraction d'ADN génomique .....	82
a.1) À partir de drosophiles adultes ou de pupes .....	82

a.2) Extraction rapide à partir de larves.....	82
b) Extraction d'ARN.....	82
b.1) À partir de têtes de drosophiles .....	82
b.2) À partir de cellules S2.....	83
c) Rétro-Transcription.....	83
d) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	84
e) PCR quantitative (qPCR).....	85
<b>Partie 4 : Immunochimie .....</b>	<b>87</b>
a) Anticorps utilisés.....	87
b) Immunohistologie sur cerveaux de drosophiles.....	88
b.1) Dissection et marquage sur cerveaux in toto de drosophiles.....	88
b.2) Cryosection et marquage sur coupes de têtes de drosophiles .....	89
c) Immunocytologie sur cellules S2 de drosophiles.....	90
d) Microscopie confocale et traitement des images .....	90
e) Western Blot.....	90
e.1) Extraction de protéines à partir d'un lysat de drosophiles.....	90
e.2) Extraction de protéines à partir d'un lysat de cellules S2.....	91
e.3) Dosage de protéines.....	91
e.4) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de PVDF.....	91
e.5) Immunodétection.....	92
f) Cytométrie en flux.....	93
<b>Partie 5 : Mesure de l'import de leucine radiomarquée dans les cellules S2.....</b>	<b>93</b>
<b>Partie 6 : Tests comportementaux.....</b>	<b>94</b>
a) Tests en Y et évaluation de la perception olfactive .....	94
b) Tests en T et évaluation de l'apprentissage et de la mémoire .....	95
c) Ethovision et évaluation de l'activité locomotrice.....	96
d) « Climbing » et évaluation du réflexe de géotaxie négative.....	97
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>99</b>
<b>Partie 1 : Profil d'expression de <i>minidiscs</i> dans le cerveau de drosophile adulte.....</b>	<b>101</b>
a) Expression de <i>minidiscs</i> dans le cerveau de drosophile adulte .....	101
a.1) Recherche par bioinformatique.....	101
a.2) Approche par biologie moléculaire (RT-PCR) .....	102
b) Étude du profil d'expression cellulaire de <i>minidiscs</i> .....	103
c) Étude de la spécificité de l'anticorps anti-Minidiscs en immunohistologie .....	105
c.1) Procédure mise en place pour tenter de créer une lignée KO pour <i>minidiscs</i> .....	105

c.2) Création de lignées permettant de déréguler l'expression de <i>mnd</i> .....	110
c.3) Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd par sur-expression de <i>mnd</i> .....	114
c.4) Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd par sous-expression de <i>mnd</i> .....	115
d) Profil d'expression de <i>minidiscs</i> dans les neurones des corps pédonculés .....	117
e) Profil d'expression de <i>minidiscs</i> dans les neurones dopaminergiques associés aux corps pédonculés .....	120
f) Discussion et perspectives.....	122
<b>Partie 2 : Rôle de Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux central .....</b>	<b>124</b>
a) Validation de l'efficacité des outils génétiques utilisés .....	124
b) Étude du rôle de Minidiscs dans l'activité locomotrice .....	127
c) Étude du rôle de Minidiscs dans la perception olfactive .....	128
d) Étude du rôle de Minidiscs dans l'apprentissage et la mémoire.....	132
e) Étude du rôle de Minidiscs sur le réflexe de géotaxie négative .....	134
f) Discussion et perspectives.....	139
<b>Partie 3 : Conformation et partenaires protéiques de Minidiscs.....</b>	<b>143</b>
a) Étude de la conformation de Minidiscs .....	143
b) Recherche des différents partenaires protéiques de Minidiscs .....	144
b.1) Recherche par bioinformatique.....	144
b.2) Mises au point pour les expériences de co-immunoprécipitation .....	147
c) Discussion et perspectives .....	156
<b>Partie 4 : Spécificité de transport de Minidiscs.....</b>	<b>157</b>
a) Propriétés du transport de leucine dans les cellules S2 .....	158
b) Effet de la sous-expression de <i>minidiscs</i> sur le transport de leucine .....	162
c) Effet de la sur-expression de <i>minidiscs</i> sur le transport de leucine.....	166
d) Inhibition du transport de leucine en présence d'acides aminés.....	169
e) Discussion et perspectives.....	171
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....</b>	<b>175</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>205</b>

## INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des différentes classes de transporteurs transmembranaires .....	26
Figure 2 : Proportion des gènes codant pour différentes classes de transporteurs transmembranaires .....	27
Figure 3 : Les différents stades du cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	38
Figure 4 : Structure schématique des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés.....	40
Figure 5 : Représentation schématique d'un neuropile de drosophile.....	44
Figure 6 : Le système nerveux central chez la drosophile adulte (vue dorsale) .....	45
Figure 7 : Représentation schématique du cerveau de drosophile dans la capsule céphalique.....	45
Figure 8 : Les différents types de cellules gliales du cerveau de drosophile .....	47
Figure 9 : Organisation anatomique du système nerveux olfactif de la drosophile .....	48
Figure 10 : Parallèle entre les structures neuro-anatomiques servant au codage de l'information olfactive chez les insectes et les mammifères.....	50
Figure 11 : Représentation des différentes catégories de neurones impliqués dans la transmission du signal olfactif et dans l'apprentissage et la mémoire.....	52
Figure 12 : Représentation schématique des trois groupes de neurones dopaminergiques afférents aux corps pédonculés .....	53
Figure 13 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la détection de la coïncidence temporelle entre stimulus conditionné et non-conditionné lors de l'apprentissage .....	54
Figure 14 : Organisation anatomique du complexe central chez la drosophile .....	55
Figure 15 : Représentation schématique des principaux groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile .....	56
Figure 16: Représentation schématique du fonctionnement du système Gal4-UAS.....	64
Figure 17 : Représentation schématique du locus <i>minidiscs</i> sur le chromosome 3L.....	65
Figure 18 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les différents fragments de <i>minidiscs</i> .....	66
Figure 19 : Structure du vecteur pGEM®-T Easy.....	67
Figure 20 : Structure du vecteur pattB-Gal4.....	68
Figure 21 : Mécanisme de l'interférence par ARN (ARNi) .....	71
Figure 22 : Représentation schématique du plasmide pJFRC7 ouvert contenant 20 séquences UAS dans lequel a été cloné l'ADNc de <i>mnd</i> .....	72

Figure 23 : Principe de la recombinaison FLP/FRT et procédure à suivre afin d'obtenir une délétion de l'ADNg situé entre deux sites FRT.....	73
Figure 24 : Différentes combinaisons possibles de lignées porteuses d'un site FRT dont le croisement permettrait la délétion de <i>mnd</i> (DrosDel).....	74
Figure 25 : Structure du vecteur pMT/V5-His A.....	77
Figure 26 : Structure du vecteur pMT-DEST48.....	78
Figure 27 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les ADNc de <i>minidiscs</i> et de <i>CD98hc</i> .79	
Figure 28 : Structure du vecteur pCR8.....	80
Figure 29 : Programme utilisé pour les qPCR.....	86
Figure 30 : Représentation schématique de Minidiscs et de la séquence peptidique reconnue par l'anticorps anti-Mnd (en rouge) .....	87
Figure 31 : Dispositif en Y servant aux tests de choix olfactifs.....	94
Figure 32 : Dispositif en T servant aux tests de mémoire olfactive aversive .....	96
Figure 33 : Dispositif expérimental permettant de mesurer l'activité de "climbing" .....	97
Figure 34 : Quantité de transcrits de <i>minidiscs</i> dans différents tissus et organes chez la drosophile adulte.....	101
Figure 35 : Schématisation du locus de <i>minidiscs</i> sur le chromosome 3L .....	102
Figure 36 : Représentation schématique de l'emplacement des amorces utilisées en RT-PCR pour amplifier spécifiquement les différents transcrits de <i>minidiscs</i> .....	103
Figure 37 : Mise en évidence de l'expression des transcrits <i>mnd-RC, RA</i> et <i>RE</i> dans les têtes de drosophiles adultes.....	103
Figure 38: Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps 61A1 et 61A2 sur cerveau de drosophile adulte .....	104
Figure 39 : Profil d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones et dans les cellules gliales.....	104
Figure 40 : Représentation schématique de l'emplacement des amorces utilisées en PCR pour vérifier la délétion de <i>minidiscs</i> .....	105
Figure 41 : Vérification de la présence et de la position des transposons porteurs d'un site FRT dans le génome des lignées <i>mnd<sup>e01921</sup></i> et <i>mnd<sup>f02785</sup></i> .....	106
Figure 42 : Vérification de la présence des deux transposons e01921 et f02785 dans le génome des lignées #23 et #25 candidates pour la délétion de <i>mnd</i> .....	107
Figure 43 : Vérification de la présence de l'exon 1 de <i>mnd</i> dans le génome de la lignée #23 candidate pour la délétion de <i>mnd</i> .....	108
Figure 44 : Vérification de la présence de l'exon 1 de <i>mnd</i> dans le génome de la lignée #25 candidate pour la délétion de <i>mnd</i> .....	108
Figure 45 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de larves témoins ou potentiellement délétées pour <i>mnd</i> .....	109

Figure 46 : Visualisation du profil d'expression des séquences régulatrices 24-1 et 25-1 dans le cerveau de drosophile adulte.....	110
Figure 47 : Visualisation du profil d'expression des séquences régulatrices 26-1 et 27-1 dans le cerveau de drosophile adulte.....	111
Figure 48 : Visualisation du profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés.....	112
Figure 49 : Profil d'expression des séquences régulatrices 24-1 et 25-1 dans les neurones et dans les cellules gliales.....	112
Figure 50 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	113
Figure 51 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 25-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	114
Figure 52 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de drosophiles témoins ou sur-exprimant <i>mnd</i> dans les corps pédonculés.....	115
Figure 53 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de drosophiles témoins ou sous-exprimant <i>mnd</i> dans les corps pédonculés.....	116
Figure 54 : Diminution du signal relatif de l'anticorps anti-Mnd 61A2 dans les cellules de Kenyon pour les drosophiles sous-exprimant <i>mnd</i> dans les corps pédonculés par rapport aux drosophiles témoins.....	117
Figure 55 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice OK107 spécifique des neurones formant les lobes $\alpha'/\beta'$ , $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	118
Figure 56 : Comparaison entre le profil d'expression de séquences régulatrices spécifiques des différents lobes des corps pédonculés et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	119
Figure 57 : Visualisation des différents groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile adulte.....	120
Figure 58 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquences TH dans les groupes de neurones dopaminergiques PPL1, PPL2ab et PAM et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	121
Figure 59 : Visualisation du groupe de neurones dopaminergiques PAM dans le cerveau de drosophile adulte et comparaison entre le profil d'expression de la séquences Ddc dans le groupe PAM et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd.....	122
Figure 60 : Comparaison du niveau d'expression relatif des transcrits de <i>mnd</i> dans des têtes de drosophiles témoins ( <i>w<sup>1118</sup></i> ) femelles et mâles.....	125
Figure 61 : Vérification de l'efficacité des différentes lignées Gal4 et UAS-ARNi sur le niveau d'expression relatif des transcrits de <i>mnd</i> dans les têtes de drosophiles femelles et mâles.....	126

Figure 62 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur l'activité locomotrice initiale des drosophiles.....	127
Figure 63 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la perception olfactive des drosophiles.....	129
Figure 64 : Représentation « éclatée » d'un dispositif en Y.....	130
Figure 65 : Effet du diamètre de l'embout des pointes du dispositif en Y, de l'espace dans le tube de départ et de la durée du test sur le taux de participation lors des tests de choix olfactif.....	131
Figure 66 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la perception olfactive des drosophiles (deuxième série de tests après ajustement) .....	131
Figure 67 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés sur la mémoire olfactive aversive des drosophiles.....	133
Figure 68 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la mémoire olfactive aversive des drosophiles.....	133
Figure 69 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd pour des drosophiles adultes de 4 semaines.....	135
Figure 70 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha/\beta$ et $\gamma$ des corps pédonculés sur l'activité de « climbing » des drosophiles.....	136
Figure 71 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les cellules gliales du cortex sur l'activité de « climbing » des drosophiles.....	136
Figure 72 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones formant les lobes $\alpha'/\beta'$ des corps pédonculés sur l'activité de « climbing » des drosophiles.....	137
Figure 73 : Visualisation du profil d'expression de la séquence régulatrice c305 dans la partie antérieure (A) et postérieure (B) du cerveau de drosophile adulte.....	138
Figure 74 : Effet de la diminution du niveau d'expression de <i>mnd</i> dans les neurones dopaminergiques sur l'activité de « climbing » des drosophiles .....	139
Figure 75 : Prédiction des domaines transmembranaires des deux isoformes de Minidiscs .....	143
Figure 76 : Prédiction des domaines transmembranaires des protéines CD98hc, CG13840, MalA5 et MalB2.....	145
Figure 77 : Représentation schématique des différents transcrits de <i>CD98hc</i> , <i>CG13840</i> , <i>Mal A5</i> et <i>Mal B2</i> .....	146

Figure 78 : Mise en évidence de l'expression des différents transcrits de <i>CD98hc</i> , <i>CG13840</i> , <i>Mal A5</i> et <i>Mal B2</i> dans les têtes de drosophiles adultes.....	146
Figure 79 : Test des anticorps anti-Mnd 61A1 et 61A2 à différentes dilutions en Western Blot sur des lysats de drosophiles témoins ( <i>w<sup>1118</sup></i> ) et sur-exprimant <i>mnd</i> (Actine-Gal4>UAS- <i>mnd</i> ).....	148
Figure 80 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-FLAG et anti-Mnd 61A2 sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant FLAG- <i>mnd</i> .....	149
Figure 81 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-FLAG et anti-HA sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant FLAG- <i>mnd</i> et <i>CD98hc</i> -HA.....	149
Figure 82 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-HA et anti-CD98hc 723 sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant <i>CD98hc</i> -HA.....	150
Figure 83 : Résultats de cytométrie en flux pour des cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG- <i>mnd</i> non induites ou induites avec du sulfate de cuivre.....	151
Figure 84 : Résultats de cytométrie en flux pour des cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG- <i>mnd</i> non induites ou induites avec du sulfate de cuivre.....	151
Figure 85 : Quantification par cytométrie en flux des cellules S2 transformées après transfection avec le plasmide pMT-FLAG- <i>mnd</i> (A) ou co-transfection avec les plasmides pMT-FLAG- <i>mnd</i> et pMT- <i>CD98hc</i> -HA (B).....	152
Figure 86 : Test des anticorps anti-FLAG en Western Blot sur des lysats de cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG- <i>mnd</i> en présence (A) ou absence (B) d'agents réducteurs.....	153
Figure 87 : Test des anticorps anti-FLAG et anti-HA en Western Blot sur des lysats de cellules S2 co-transfectées avec les plasmides pMT-FLAG- <i>mnd</i> et pMT- <i>CD98hc</i> -HA en présence ou absence d'agents réducteurs.....	155
Figure 88 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 au cours du temps.....	159
Figure 89 : Effet du sodium, du BCH et de la température sur la quantité de leucine importée dans les cellules S2.....	160
Figure 90 : Représentation Michaelienne du transport d'acides aminés (courbes théoriques).....	161
Figure 91 : Représentation de Hanes-Woolf (droite théorique).....	161
Figure 92 : Représentation Michaelienne (A) et de Hanes-Woolf (B) de la quantité de leucine importée dans les cellules S2 en fonction de la concentration de leucine (valeurs expérimentales).....	162
Figure 93 : Niveau d'expression relatif des transcrits de <i>mnd</i> dans des cellules S2 en culture après 48 heures ou 120 heures d'incubation avec des dsRNA dirigés contre <i>mnd</i> (avec ou sans Effectène).....	163
Figure 94 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 non traitées ou traitées avec des dsRNA dirigés contre <i>mnd</i> et/ou <i>Jhl-21</i> .....	164



Figure 95 : Niveau d'expression relatif des transcrits de <i>mnd</i> , <i>gb</i> , <i>Jhl-21</i> et <i>CD98hc</i> dans des cellules S2 en culture traitées avec des dsRNA dirigés contre <i>mnd</i> et/ou <i>Jhl-21</i> .....	165
Figure 96 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG- <i>mnd</i> induites ou non avec du sulfate de cuivre.....	167
Figure 97 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT- <i>mnd</i> induites ou non avec du sulfate de cuivre.....	168
Figure 98 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec les plasmides pMT-FLAG- <i>mnd</i> et pMT- <i>CD98hc</i> -HA induites ou non avec du sulfate de cuivre.....	169
Figure 99 : Inhibition du transport de leucine dans les cellules S2 par différents acides aminés et dérivés.....	170
Figure 100 : Profil d'expression connu de <i>mnd</i> dans le cerveau de drosophile adulte.....	178
Figure 101 : Rôle putatif de Minidiscs sur le comportement.....	180
Figure 102 : Description des caractéristiques moléculaires de Mnd.....	182
Figure 103 : Effet de la présence de différents acides aminés sur la quantité de leucine importée par le système L dans des cellules humaines et de drosophiles .....	184
Figure 104 : Activation de mTORC1 par l'import glutamine-dépendant de leucine.....	185
Figure 105 : Implication du cycle des acides aminés ramifiés dans le métabolisme du glutamate au niveau du système nerveux central.....	186
Figure 106 : Mode d'action hypothétique de Minidiscs dans le cerveau de drosophile expliquant son rôle dans la régulation du comportement.....	187

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Les sous-familles de transporteurs SLC1 appartenant au système X <sub>AG</sub> .....	29
Tableau II : Les sous-familles de transporteurs SLC1 appartenant au système ASC .....	29
Tableau III : Les sous-familles de transporteurs SLC3 .....	29
Tableau IV : Les sous-familles de transporteurs SLC6 .....	30
Tableau V : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines CAT.....	30
Tableau VI : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système L.....	32
Tableau VII : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système y <sup>+</sup> L.....	32
Tableau VIII : La sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système x <sub>c</sub> <sup>-</sup> .....	33
Tableau IX : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système asc.....	34
Tableau X : La sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système b <sup>0,+</sup> .....	34
Tableau XI : Les sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT non classées dans un système de transport.....	35
Tableau XII : Les sous-familles de transporteurs SLC17 impliquées dans le transport d'acides aminés.....	35
Tableau XIII : Les sous-familles de transporteurs SLC25 impliquées dans le transport d'acides aminés.....	36
Tableau XIV : La sous-famille de transporteurs SLC32.....	36
Tableau XV : Les sous-familles de transporteurs SLC36.....	36
Tableau XVI : Les sous-familles de transporteurs SLC38 impliquées dans le transport d'acides aminés.....	37
Tableau XVII : Les sous-familles de transporteurs SLC43 impliquées dans le transport d'acides aminés et appartenant au système L.....	37
Tableau XVIII : Liste des lignées Gal4 commandées au Bloomington Stock Center .....	64
Tableau XIX : Caractéristiques des différentes amorces utilisées pour l'amplification des séquences régulatrices de <i>mnd</i> (site KpnI souligné) .....	65
Tableau XX : Conditions utilisées pour la PCR.....	66
Tableau XXI : Liste des lignées UAS utilisées.....	70
Tableau XXII : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc de <i>mnd</i> et conditions utilisées pour la PCR.....	72

Tableau XXIII : Liste des lignées utilisées pour la délétion de <i>minidiscs</i> .....	74
Tableau XXIV : Caractéristiques des amorces utilisées pour la synthèse <i>in vitro</i> de dsRNA- <i>mnd</i> et conditions utilisées pour la PCR.....	75
Tableau XXV : Caractéristiques des différentes amorces utilisées pour l'amplification des ADNc de <i>mnd</i> et de <i>CD98hc</i> .....	79
Tableau XXVI : Liste des amorces utilisées en PCR.....	84
Tableau XXVII : Liste des amorces utilisées en RT-PCR.....	85
Tableau XXVIII : Liste des amorces utilisées en qPCR.....	86
Tableau XXIX : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistologie, immunocytologie, Western Blot (WB) et/ou cytométrie en flux.....	88
Tableau XXX : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunohistologie, immunocytologie, Western Blot et/ou cytométrie en flux .....	88

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : degré Celsius  
**3L** : bras gauche (Left) du chromosome 3  
**4-S-CPG** : (S)-4-carboxyphenylglycine  
**aa** : acides aminés  
**aa\*** : acides aminés radiomarqués  
**ABC** : Transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette)  
**AC** : Adénylate Cyclase  
**ACh** : AcétylCholine  
**ACT** : Tractus Antennaire Cérébral  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**ADNg** : ADN génomique  
**AKG** :  $\alpha$ -KétoGlutarate  
**AL** : Lobes Antennaires  
**Ala** : Alanine  
**ALT** : ALanine Transaminase  
**Amp<sup>R</sup>** : Ampicilline-Résistant  
**AN** : Nerf Antennaire  
**APLn** : neurones appariés latéraux antérieurs (Anterior Paired Lateral neurons)  
**APS** : Ammonium PerSulfate  
**Arg** : Arginine  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ARNi** : ARN interférent  
**ARNm** : ARN messenger  
**Asn** : Asparagine  
**Asp** : acide Aspartique  
**ATPases** : Pompes ATPases  
**BCATc** : Branched-Chain AminoTransferase cytosolic  
**BCATm** : Branched-Chain AminoTransferase mitochondrial  
**BCH** : acide 2-aminoBicyclo-(2,2,1)-Heptane-2-Carboxylique  
**bla** : beta-lactamase  
**C** ou **CA** : Calices  
**C-ter** : COOH-terminale  
**CaM** : Calmoduline  
**cAMP** : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
**CAT** : Transporteurs d'Acides aminés Cationiques  
**CC** : Complexe central  
**CD98hc** : CD98 heavy chain  
**Cs** : *Canton S*  
**Ct** : Cycle threshold  
**Cyc** : Cyclophiline  
**Cys** : Cystéine  
**D-** : *Dexter* (conformation de Fischer)  
**Da** : Dalton  
**DA** : Dopamine / Dopaminergique  
**DALn** : neurones latéraux dorso-antérieurs (Dorsal Anterior Lateral neurons)  
**DAn** : neurones Dopaminergiques  
**DAr** : récepteur à la Dopamine  
**Ddc** : DOPA décarboxylase

**DNase** : DésoxyriboNucléase  
**dNTP** : désoxyriboNucléotide Tri Phosphate  
**DOPA** : 3,4-DihydroxyPhénylAlanine  
**DPM** : Désintégrations Par Minute  
**DPMn** : neurones appariés dorso-médians (Dorsal Paired Medial neurons)  
**dsRNA** : double stranded RNA  
**DTT** : DiThioThrétol  
***E. coli*** : *Escherichia coli*  
**EB** : Corps Ellipsoïde (Ellipsoid Body)  
**ECL** : Enhanced Chemiluminescence Light  
**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique  
**EMS** : MéthaneSulfonate d'Éthyle  
**Ex.** : Exon  
**FasII** : FasciclinII  
**FB** : Corps en éventail (Fan shaped Body)  
**FLP** : Flippase  
**For** : Forward  
**FRT** : Flippase Recognition Target  
**G, A, T, C** : Guanine, Adénine, Thymines, Cytosine  
**Gb** : Genderblind  
**GDH** : Glutamate DeHydrogenase  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**Gln** : Glutamine  
**Glu** : acide Glutamique  
**Gly** : Glycine  
**GPCR** : récepteurs couplés aux protéines G  
**GS** : Glutamine Synthetase  
**H<sup>+</sup>** : ion hydrogène  
**HA** : Human influenza hemagglutinin  
**HAT** : Transporteurs Hétérodimériques d'Acides aminés  
**HCl** : Chlorure d'Hydrogène  
**HGNC** : HUGO Gene Nomenclature Committee  
**His** : Histidine  
**HRP** : Horse Radish Peroxidase  
**hsFLP** : heat shock Flippase  
**Hsp70** : Protéine de choc thermique (Heat shock protein) de 70 kDa  
**HUGO** : HUman Genome Organisation  
**IgG** : Immunoglobuline G  
**iGluR** : Récepteurs ionotropiques au glutamate  
**Ile** : Isoleucine  
**In** : Inter-neurones  
**IR** : Récepteur Ionotropique  
**Jh1-21** : Juvenile hormone Inducible-21  
**K<sup>+</sup>** : ion potassium  
**KC** : Cellules de Kenyon  
**KIC** :  $\alpha$ -KetoIsoCaproate  
**K<sub>M</sub>** : constante de Michaelis  
**KO** : Knock Out  
**L-** : *Laevus* (conformation de Fischer)  
**Lac** : Lactate  
**LAT** : Transporteurs d'Acides aminés de la série L

**LDH** : Lactate DeHydrogenase  
**Leu** : Leucine  
**LGIC** : Canaux Ioniques Ligand Dépendant (Ligand Gated Ion Channels)  
**LH** : Corne Latérale (Lateral Horn)  
**Lys** : Lysine  
**M** : molaire (mol/litre)  
**Mal** : Maltase  
**MB** : Corps Pédonculés (Mushroom Bodies)  
**MB-V2n** et **MB-V3n** : neurones Ventraux liés aux Corps Pédonculés de type 2 et 3  
**Met** : Méthionine  
**Mg<sup>2+</sup>** : ion magnésium  
**min** : minute  
**mL** : millilitre  
**Mnd** : Minidisks  
**N** : nombre de répétitions (tests de comportement)  
**N-ter** : NH<sub>2</sub>-terminale  
**Na<sup>+</sup>** : ion sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de Sodium  
**NGS** : Normal Goat Serum  
**NH<sub>4</sub>** : Ammonium  
**nls**: nuclear localization signal  
**nm** : nanomètre  
**NO** : Nodules appariés  
**ns** : non significatif  
**OAn** : neurones Octopaminergiques  
**OIC** : Autres Canaux Ioniques (Other Ion Channels)  
**OL** : Lobe Optique  
**OR** : Récepteur Olfactif  
**ORn** : neurones Récepteurs Olfactifs  
**P** : Pédoncule  
**PAG** : Phosphate-Activated Glutaminase  
**PAL** : Protocerebral Anterior Lateral  
**PAM** : Protocerebral Anterior Medial  
**Pb** : Paires de bases  
**PB** : Pont protocérébral (Protocerebral Bridge)  
**PBS** : Phosphate Buffered Saline  
**PBS-S** : PBS-Saponine  
**PBS-T** : PBS-Triton  
**PC** : Protocérébron  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PFA** : ParaFormAldéhyde  
**Phe** : Phénylalanine  
**PI** : Pars Intercerebralis  
**PM** : Poids Moléculaire  
**PMSF** : Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle  
**Pn** : neurones de Projection ;  
**PPL** : Protocerebral Posterior Lateral  
**PPM** : Protocerebral Posterior Medial  
**Pro** : Proline  
**PVDF** : PolyVinylidène DiFluoride  
**Pyr** : Pyruvate

**qPCR** : PCR quantitative  
**Rev** : Reverse  
**RISC**: RNA-Induced Silencing Complex  
**RNase** : RiboNucléase  
**RT** : Rétro-Transcription  
**S** : Substrat  
**SAB** : Serum Albumine Bovine  
**SDS**: Sodium Dodecyl Sulfate  
**Ser** : Sérine  
**siRNA** : small interfering RNA  
**SLC** : Transporteurs SLC (Solute Carrier)  
**SOG** : Ganglion Sous-Oesophagien  
**SVF** : Sérum de Veau Fœtal  
**T°** : Température  
**Taq** : Thermophilus aquaticus  
**TBS-T** : TBS-Triton (pour les cryosections) ou TBS-Tween (pour les Western Blot)  
**TBS**: Tris Buffered Saline  
**TEMED** : Tetramethylethylenediamine  
**TH** : Tyrosine Hydroxylase  
**Thr** : Thréonine  
**TM6b** : Third Multiple 6b  
**Tris**: Trishydroxyméthylaminométhane  
**Trp** : Tryptophane  
**Tub**: Tubuline  
**Tyr** : Tyrosine  
**U.A.** : Unité Arbitraire  
**UAS** : Upstream Activating Sequence  
**UTR** : Région non traduite (UnTranslated Region)  
**V** : Vitesse  
**Val** : Valine  
**VDCC** : Canaux Calciques Voltage-Dépendants  
**VGIC** : Canaux Ioniques Voltage-Dépendants (Voltage Gated Ion Channels)  
**Vi** : Vitesse initiale  
**Vmax** : Vitesse maximale  
**VNC** : Chaîne Nerveuse Ventrale  
**w** : *white*  
 **$\alpha/\beta, \alpha'/\beta', \gamma$**  : Lobes des corps pédonculés  
 **$\mu\text{L}$** : microlitre  
 **$\mu\text{m}$**  : micromètre

# INTRODUCTION





## INTRODUCTION

J'ai réalisé ma thèse au sein du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation dans l'équipe « Perception Sensorielle, Interactions Glie/Neurones » dirigée par le Dr. Grosjean. Cette équipe cherche notamment à comprendre comment certaines odeurs de nourriture peuvent modifier le comportement social. Dans cette optique, l'un des axes de recherche de cette équipe concerne le rôle des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) appartenant à la famille des protéines SLC (SLC3 et SLC7; cf. Partie 1-c.4.2 de l'introduction) dans le fonctionnement du système nerveux et la perception chimiosensorielle. Pour atteindre cet objectif, la drosophile (*Drosophila melanogaster*) est utilisée comme modèle d'étude. Mon projet de thèse a porté sur l'étude du rôle de l'une des protéines HAT de drosophile, Minidiscs, dans le fonctionnement du système nerveux.

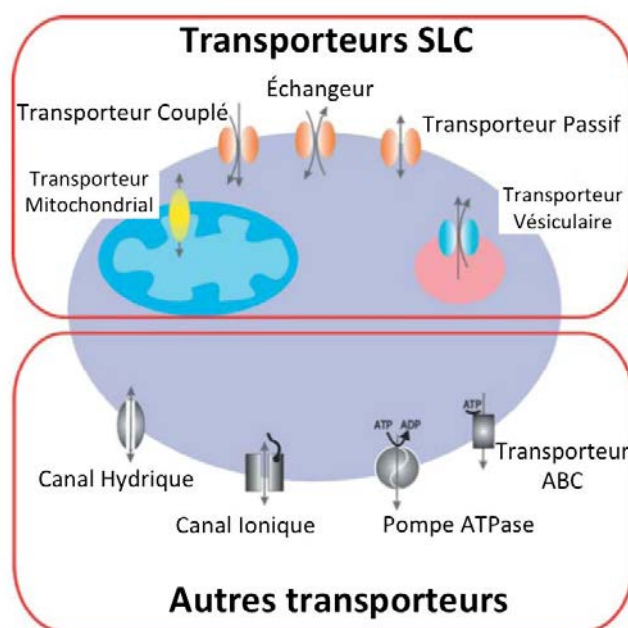
### Partie 1 : Les transporteurs transmembranaires d'acides aminés

Les acides aminés sont des éléments essentiels pour les organismes vivants. Outre leur rôle fondamental comme constituants élémentaires des protéines, les acides aminés régulent fortement la physiologie cellulaire. Ces molécules sont par exemple des précurseurs dans la formation du glucose et de l'acétyl-CoA qui sont nécessaires à la synthèse d'ATP (Bergeron *et al.*, 2008). De plus, certains acides aminés ont également un rôle important en tant que neurotransmetteurs, tels que le glutamate et l'aspartate, ou en tant que précurseurs de neurotransmetteurs, tels que la tyrosine (pour la synthèse de dopamine) et le tryptophane (pour la sérotonine) (Bergeron *et al.*, 2008; Vömel et Wegener, 2008). Les troubles du métabolisme des acides aminés font partie des maladies héréditaires du métabolisme les plus courantes chez l'Homme (Lee, 2011). Ces maladies peuvent avoir des répercussions importantes sur les fonctions neurologiques. Ainsi, l'hyperglycinémie non cétosique et la leucinose provoquent des crises d'épilepsies tandis que la phénylcétonurie est impliquée dans l'apparition de retards mentaux progressifs (Lee, 2011). De plus, de nombreuses maladies telles que la cystinurie, le syndrome de Hartnup, l'intolérance aux protéines lysinuriques (LPI) ou encore l'hyperaminoacidurie dicarboxylique, sont liées au dysfonctionnement de certains transporteurs d'acides aminés (Camargo *et al.*, 2008). Comprendre comment les acides aminés sont incorporés dans les cellules ou comment ils sont sécrétés dans les espaces synaptiques, constituent donc des enjeux fondamentaux pour décrypter le fonctionnement physiologique ou pathologique du système nerveux.

### a) Les différentes classes de transporteurs transmembranaires

Les membranes cellulaires sont composées de lipides, de protéines et de glucides et permettent aux cellules de contrôler la composition des milieux cytoplasmique et extracellulaire. Parmi les protéines de la membrane plasmique, différents transporteurs transmembranaires permettent l'entrée et/ou la sortie sélective des molécules indispensables au fonctionnement cellulaire (César-Razquin *et al.*, 2015). Ces transporteurs peuvent être divisés en trois classes : les canaux (hydriques, ioniques), les transporteurs ATP-dépendants (pompes ATPases, transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette)) et les transporteurs SLC (Solute Carrier) (Figure 1 ; Hediger *et al.*, 2004).

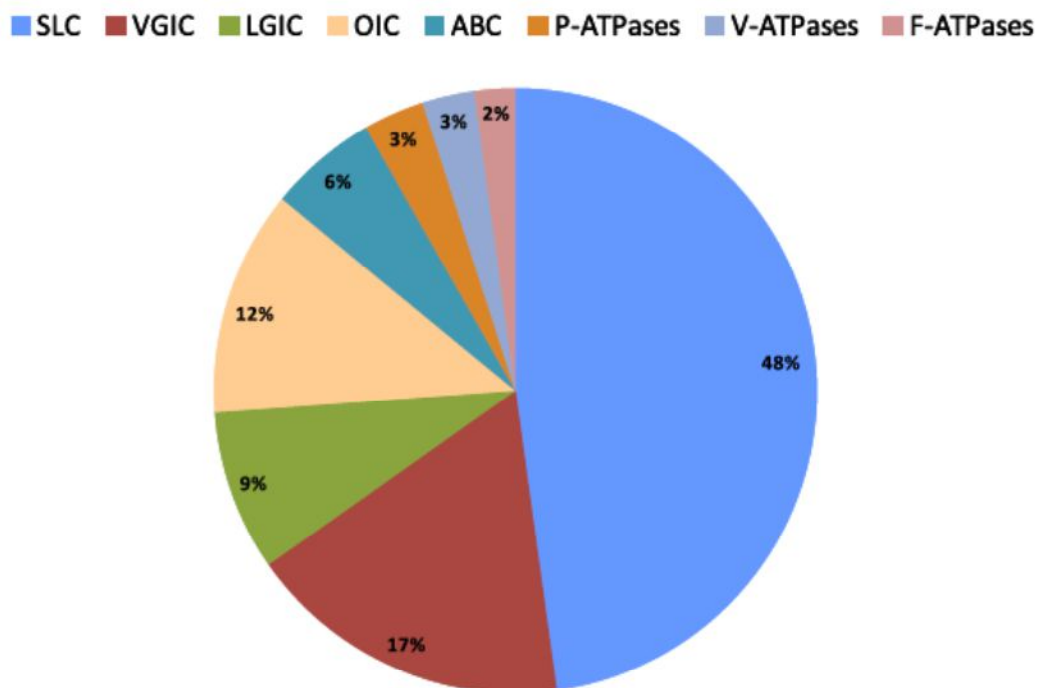
Les protéines SLC assurent le transport de différents solutés dont font notamment partie les acides aminés. Le transport des acides aminés est soit passif (dans le sens du gradient de concentration de l'acide aminé transporté), soit actif (les acides aminés sont transportés contre leur gradient de concentration). Le transport actif d'un acide aminé est permis par le couplage de ce transport avec celui d'un autre soluté transporté dans le sens de son gradient de concentration, tel que le Na<sup>+</sup> ou le H<sup>+</sup>. En général, les transporteurs SLC actifs utilisent le gradient de concentration d'un ion généré par une pompe ATPase pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Bergeron *et al.*, 2008).



**Figure 1 : Représentation schématique des différentes classes de transporteurs transmembranaires**

Les différents types de transporteurs SLC sont représentés dans la partie supérieure du schéma, soit au niveau de la membrane plasmique, soit au niveau de la membrane des compartiments intracellulaires. Les différents types de transporteurs n'appartenant pas aux transporteurs SLC sont représentés dans la partie inférieure du schéma à la membrane plasmique mais peuvent également être présents à la membrane des compartiments intracellulaires (modifié d'après Hediger *et al.*, 2004).

Ce sont les transporteurs SLC, avec leurs 456 membres classés en 52 familles, qui représentent la classe de protéines transmembranaires la plus large et la plus conservée entre toutes les espèces animales (César-Razquin *et al.*, 2015; Featherstone, 2011). Dans le génome humain, 48% des gènes codant pour des transporteurs transmembranaires appartiennent à la famille des transporteurs SLC (Figure 2 ; Hediger *et al.*, 2013). La base de données du comité « HUGO » de Nomenclature des Gènes (HGNC, « HUman Genome Organisation » Gene Nomenclature Committee ; <http://www.genenames.org/>) répertorie ainsi près de 400 gènes codant pour les transporteurs SLC.



**Figure 2 : Proportion des gènes codant pour différentes classes de transporteurs transmembranaires**

Répartition des 826 gènes humains dans les différentes classes de transporteurs ; SLC = Transporteurs SLC (Solute Carrier) ; VGIC = Canaux Ioniques Voltage Dépendants (Voltage Gated Ion Channels) ; LGIC = Canaux Ioniques Ligand Dépendants (Ligand Gated Ion Channels); OIC = Autres Canaux Ioniques (Other Ion Channels) (ex : canaux hydriques,...); ABC = Transporteurs ABC; ATPases = Pompes ATPases (de type P, V ou F) (Hediger *et al.*, 2013).

De nouveaux transporteurs SLC étant encore identifiés, un site internet concernant ces transporteurs et leur rôle dans différentes maladies humaines a été créé et est régulièrement mis à jour (<http://www.bioparadigms.org/SLC/menu.asp>).

L'absence, la surexpression ou le dysfonctionnement des transporteurs SLC peut générer différentes maladies comme l'épilepsie, l'ostéoporose, le diabète, le cancer ou encore l'hypertension (Bergeron *et al.*, 2008; Fotiadis *et al.*, 2013). En plus des recherches fondamentales menées sur ces transporteurs, ceux-ci sont donc de plus en plus étudiés

dans le but de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces différentes pathologies.

### b) Nomenclature des gènes codant pour les transporteurs SLC

Le système de nomenclature désignant les gènes codant pour les transporteurs SLC a été mis en place dans les années 1990 par Matthias Hediger en collaboration avec Phyllis McAlpine, qui fut l'une des fondatrices du HGNC, et continue d'être mis à jour avec Elspeth Bruford qui dirige actuellement ce comité.

Le nom d'un gène appartenant à cette classe de transporteurs est constitué du sigle SLC (Solute Carrier) suivi du numéro de famille (52 familles sont actuellement répertoriées), de la lettre de sous-famille (seul A est utilisé lorsque la famille n'a pas été sous-divisée), et enfin du numéro du gène dans cette sous-famille (ex : SLC1A1).

Un transporteur est classé dans une famille s'il possède au moins 20% d'identité de séquence avec les autres membres de cette famille. Alors que cette classification avait initialement été mise en place pour les gènes humains, certaines familles ou sous-familles ont été ajoutées pour inclure des gènes identifiés uniquement chez le rongeur (ex : Slc7a12, plusieurs membres de la famille SLC22) ou encore chez l'insecte (ex : slc18a4) (Hediger *et al.*, 2013).

### c) Les différentes familles de transporteurs d'acides aminés

Les transporteurs SLC contrôlent le transport transmembranaire de nombreux types de substrats importants tels que les neurotransmetteurs, les acides aminés, les métabolites, ainsi que certains médicaments et toxines (Hediger *et al.*, 2004). Parmi tous les substrats transportés par les protéines SLC, les acides aminés sont les molécules les plus transportées. En effet, les familles de transporteurs SLC impliquées dans le transport d'acides aminés représentent 25% des protéines SLC chez l'humain (Fredriksson *et al.*, 2008).

#### c.1) Les transporteurs SLC1

La famille de transporteurs SLC1 est constituée de sept sous-familles classées selon leur spécificité de substrat dans deux systèmes de transport différents : le système X<sub>AG</sub> (Tableau I) et le système ASC (Tableau II).

**Tableau I : Les sous-familles de transporteurs SLC1 appartenant au système X<sub>AG</sub>**  
(Kanai *et al.*, 2013; Zerangue et Kavanaugh, 1996)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression	Maladies liées	Rôle
SLC1A1 / EAAT3	L-Glu D/L-Asp	<b>système X<sub>AG</sub></b> Na <sup>+</sup> dépendant H <sup>+</sup> dépendant K <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau (neurones)</b> , intestin, reins, foie, cœur, placenta	maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, épilepsie, ...	Protection contre la neurotoxicité due à l'accumulation de glutamate dans l'espace inter-synaptique
SLC1A2 / EAAT2			<b>cerveau (neurones/ cellules gliales)</b> , foie, pancréas		
SLC1A3 / EAAT1			<b>cerveau (cellules gliales)</b> , cœur, muscles squelettiques, placenta		
SLC1A6 / EAAT4			<b>cervelet</b>	ataxie spino- cérébelleuse	
SLC1A7 / EAAT5			rétine		

**Tableau II : Les sous-familles de transporteurs SLC1 appartenant au système ASC**  
(Arriza *et al.*, 1993; Bröer *et al.*, 2000; Shafqat *et al.*, 1993)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC1A4 / ASCT1	L-Ala, L-Ser, L-Cys, L-Thr	<b>système ASC</b> Na <sup>+</sup> dépendant	<b>ubiquitaire</b>
SLC1A5 / ASCT2	L-Ala, L-Ser, L-Cys, L-Thr, L-Gln, L-Asn		poumons, muscles squelettiques, colon, reins, gonades, tissu adipeux

### c.2) Les transporteurs SLC3

Les transporteurs SLC3, divisés en deux sous-familles (Tableau III), ne transportent pas directement les acides aminés mais font partie du complexe formant les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT ; *cf.* Partie 1-c.4.2 de l'introduction). En effet, les protéines HAT sont constituées d'une chaîne lourde SLC3 permettant le trafic du complexe protéique à la membrane plasmique et d'une chaîne légère SLC7 impliquée dans le transport et la spécificité de substrat (Verrey *et al.*, 2004).

**Tableau III : Les sous-familles de transporteurs SLC3**  
(Fotiadis *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC3A1 / rBAT / NBAT	(cf. SLC7A9)		reins, intestin grêle, foie, pancréas
SLC3A2 / 4F2hc / CD98hc	(cf. SLC7A5-8 et SLC7A10-11)		<b>ubiquitaire</b>

### c.3) Les transporteurs SLC6

La famille de transporteurs SLC6 comporte vingt-et-une sous-familles (Tableau IV).

**Tableau IV : Les sous-familles de transporteurs SLC6**

(Hahn et Blakely, 2007; Pramod *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression	Maladies liées
SLC6A1 (...) SLC6A21	différents acides aminés (Gly, Pro,...) et dérivés d'acides aminés (sérotonine, dopamine, GABA, noradrénaline, taurine,...) ayant pour la plupart un rôle de neurotransmetteur	Na <sup>+</sup> dépendant	principalement exprimés dans le <b>cerveau</b> (mais également dans d'autres organes selon les sous-familles)	autisme, maladie de Parkinson, schizophrénie, syndrome de la Tourette, troubles obsessionnels compulsifs, dépression, ...

### c.4) Les transporteurs SLC7

La famille de transporteurs SLC7 est constituée de quinze sous-familles divisées en deux groupes : les transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) et les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) (Verrey *et al.*, 2004).

#### c.4.1) Les transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) :

Toutes les sous-familles de transporteurs d'acides aminés cationiques (CAT) dont la spécificité de transport est connue appartiennent au système de transport y<sup>+</sup> (Tableau V).

**Tableau V : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines CAT**

(Closs *et al.*, 2006; Fotiadis *et al.*, 2013; White et Christensen, 1982)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression	Rôle
SLC7A1 / CAT-1	L-acides aminés cationiques	Système y <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> indépendant	<b>ubiquitaire</b> (sauf foie et glandes lacrymales)	principale voie d'entrée des acides aminés cationiques dans les cellules non épithéliales, rôle clé dans le métabolisme cellulaire (synthèse de protéines, formation de monoxyde d'azote, d'urée, de créatinine et d'agmatine à partir de l'arginine,...)
SLC7A2 / CAT-2			foie, muscles squelettiques, pancréas	
SLC7A3 / CAT-3			<b>cerveau (neurones),</b> gonades, ovaires, thymus	
SLC7A4 / CAT-4			<b>cerveau,</b> gonades, placenta	
SLC7A14			fortement exprimé dans le <b>système nerveux central</b>	

#### *c.4.2) Les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) :*

Les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) (constitués d'une chaîne lourde SLC3 et d'une chaîne légère SLC7) sont classés selon leur spécificité de substrat dans cinq systèmes de transport différents : le système L (Tableau VI), le système y<sup>+</sup>L (Tableau VII), le système x<sub>c</sub><sup>-</sup> (Tableau VIII), le système asc (Tableau IX) et le système b<sup>0,+</sup> (Tableau X).

L'équipe dirigée par le Dr. Grosjean travaille sur cette catégorie de transporteurs d'acides aminés et sur leurs rôles dans le fonctionnement du système nerveux en utilisant la drosophile comme modèle neurogénétique.

##### - Le système L :

Les protéines du système L sont des transporteurs sodium-indépendants d'acides aminés neutres inhibés par l'acide 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylique (BCH) qui est un analogue synthétique non métabolisable d'acide aminé (Tableau VI) (Kageyama *et al.*, 2000; Mastroberardino *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2002). C'est à ce système de transport qu'appartiendrait l'orthologue de chaîne légère HAT Minidisks (Mnd) que j'ai étudié lors de ma thèse.

Les acides aminés ramifiés transportés par les protéines du système L interviennent dans l'activation de la voie TOR qui est impliquée dans la traduction des protéines, la prolifération cellulaire et dans l'autophagie (Kurayama *et al.*, 2011; Nicklin *et al.*, 2009). Ainsi, les transporteurs du système L ont un rôle dans la croissance des cellules saines mais sont également impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses (Kanai et Endou, 2001; Yanagida *et al.*, 2001). En effet, de nombreuses lignées cellulaires tumorales (ex : cancer du colon, de l'estomac, du larynx, du poumon, du cerveau, ...) sur-expriment certains transporteurs d'acides aminés tels que LAT1 (Oda *et al.*, 2010). Des inhibiteurs de LAT1 (BCH, JPH203, KYT-0353, ...) induisent une diminution de la viabilité et de la croissance des lignées de cellules cancéreuses humaines, faisant ainsi de LAT1 une cible thérapeutique intéressante pour les traitements anti-cancer (Janpipatkul *et al.*, 2014; Oda *et al.*, 2010; Rosilio *et al.*, 2015).

Il a d'autre part été montré que LAT1 assure le transport de la tyrosine et de la L-DOPA, deux précurseurs de la dopamine, au niveau des capillaires sanguins de la barrière hémato-encéphalique (Kageyama *et al.*, 2000). Un dysfonctionnement dans le système dopaminergique étant l'une des causes connues de la maladie de Parkinson, ces résultats indiquent que LAT1 pourrait donc être également une cible thérapeutique intéressante pour les traitements contre cette maladie (Kageyama *et al.*, 2000; Ohtsuki *et al.*, 2010).



**Tableau VI : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système L**

(Fotiadis *et al.*, 2013; Meier *et al.*, 2002; Verrey, 2003)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A5 / LAT1	SLC3A2 / 4F2hc / CD98hc	larges L-acides aminés neutres, L-DOPA, hormones thyroïdiennes	<b>système L</b> Na <sup>+</sup> indépendant Sensible au BCH	<b>cerveau</b> , ovaires, gonades, placenta, rate, colon, lymphocytes activés
SLC7A8 / LAT2		L-acides aminés neutres, hormones thyroïdiennes		<b>cerveau</b> , intestin grêle, reins, poumons, cœur, rate, foie, placenta, prostate, ovaires, gonades, muscles squelettiques

- Le système y<sup>+</sup>L :

Les protéines du système y<sup>+</sup>L ont la particularité d'être les seuls transporteurs de la famille SLC7 à être partiellement sodium-dépendants (pour le transport d'acides aminés neutres mais pas pour le transport d'acides aminés cationiques) (Tableau VII), les CAT et les autres HAT étant sodium-indépendants (Kanai *et al.*, 2000).

La protéine y<sup>+</sup>LAT1 est nécessaire à la réabsorption intestinale et rénale des acides aminés cationiques. La mutation de cette protéine engendre une intolérance aux protéines lysinuriques (LPI) qui est une forme rare d'acidourie primaire héréditaire (Borsani *et al.*, 1999; Torrents *et al.*, 1999).

**Tableau VII : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système y<sup>+</sup>L**

(Fotiadis *et al.*, 2013; Kanai *et al.*, 2000; Pfeiffer *et al.*, 1999; Torrents *et al.*, 1998)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A7 / y <sup>+</sup> LAT1	SLC3A2 / 4F2hc / CD98hc	acides aminés cationiques (Na <sup>+</sup> indépendant),	<b>système y<sup>+</sup>L</b> partiellement Na <sup>+</sup> dépendant	intestin grêle, reins, rate, leucocytes, placenta, poumons
SLC7A6 / y <sup>+</sup> LAT2		larges L-acides aminés neutres (Na <sup>+</sup> dépendant)		<b>cerveau</b> , intestin grêle, gonades, glande parotide, cœur, reins, poumons, thymus

- Le système x<sub>c</sub><sup>-</sup> :

L'échange d'une molécule de cystine contre une molécule de glutamate par le système x<sub>c</sub><sup>-</sup> (Tableau VIII) est inhibé par le (S)-4-carboxyphenylglycine (4-S-CPG), sans affecter le transport de glutamate par le système X<sub>AG</sub> (famille SLC1) (Patel *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 1999).

Le système  $x_c^-$  est impliqué dans l'import de cystine nécessaire à la synthèse de la forme réduite du glutathion qui est formé par l'association d'une molécule d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion est un antioxydant majeur permettant le maintien du potentiel redox dans les cellules ainsi que l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (Conrad et Sato, 2012).

Le système  $x_c^-$  est également impliqué dans le relargage non vésiculaire du glutamate et donc dans le fonctionnement du système nerveux, le glutamate ayant un rôle de neurotransmetteur excitateur (Augustin *et al.*, 2007; Bridges *et al.*, 2012a; Grosjean *et al.*, 2008; Williams et Featherstone, 2014). Le dysfonctionnement de ce transporteur agit directement sur la concentration de glutamate extracellulaire dans plusieurs zones du cerveau (Baker *et al.*, 2003; De Bundel *et al.*, 2011; Melendez *et al.*, 2005).

En conséquence de ce double rôle, entre régulation du stress oxydatif et du niveau de glutamate extracellulaire, le système  $x_c^-$  est impliqué dans un large panel de maladies nerveuses. Ce transporteur semble ainsi impliqué dans l'addiction aux drogues, la schizophrénie, la croissance de certaines tumeurs cérébrales et dans plusieurs maladies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la sclérose amyotrophique latérale (Bridges *et al.*, 2012b).

**Tableau VIII : La sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système  $x_c^-$**

(Bridges *et al.*, 2012a; Fotiadis *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2004)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A11 / xCT	SLC3A2 / 4F2hc / CD98hc	Cystine, L-Glu	<b>système <math>x_c^-</math></b> Na <sup>+</sup> indépendant Cl <sup>-</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , macrophages, rétine, foie, reins

#### - Le système asc :

Comme les transporteurs SLC1 appartenant au système ASC, les transporteurs SLC7 du système asc assurent le transport d'acides aminés neutres avec une affinité forte pour la L-alanine, la L-sérine et la L-cystéine (Tableau IX). Asc-1 a par ailleurs la particularité, par rapport aux autres HAT, de transporter aussi les petits acides aminés neutres de la série D (la D-serine en particulier) et de ne pas fonctionner exclusivement comme échangeur d'acides aminés (Chairoungdua *et al.*, 2001; Fukasawa *et al.*, 2000; Nakauchi *et al.*, 2000). Le transporteur Asc-1 semble avoir un rôle dans le fonctionnement du système nerveux en régulant la concentration synaptique de la glycine et de la D-sérine. Ces deux acides aminés sont des co-agonistes du glutamate dans l'activation des récepteurs ionotropes NMDA

(Rosenberg *et al.*, 2013). Les récepteurs NMDA sont impliqués dans la mémoire et la plasticité synaptique, et semblent intervenir dans certaines maladies nerveuses telles que la dépression et la maladie de Parkinson (Traynelis *et al.*, 2010). Chez la souris, la délétion d'Asc-1 provoque des tremblements et des convulsions qui sont réduits en traitant ces souris avec un antagoniste des récepteurs NMDA, ce qui démontre le rôle des transporteurs Asc-1 dans la régulation de l'excitabilité neuronale (Xie *et al.*, 2005).

**Tableau IX : Les sous-familles de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système asc**

(Fotiadis *et al.*, 2013; Verrey *et al.*, 2004)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A10 / Asc-1	SLC3A2 / 4F2hc / CD98hc	petits L- et D-acides aminés neutres (D-Ser en particulier), acide $\alpha$ -aminoisobutyrique, $\beta$ -Alanine	<b>système asc</b> Na <sup>+</sup> indépendant	<b>système nerveux central</b> , intestin grêle, poumons, cœur, placenta, muscles squelettiques, reins
Slc7a12 / Asc-2	Non identifiée	petits L-acides aminés neutres		reins, placenta, rate, poumons, muscles squelettiques

- Le système b<sup>0,+</sup>:

Contrairement aux autres protéines HAT, les protéines du système b<sup>0,+</sup> ont la particularité de former des hétérotétramères composés de deux hétérodimères (liaison covalente entre la chaîne légère b<sup>0,+</sup>AT et la chaîne lourde rBAT ; Tableau X) associés ensemble de façon non covalente (Fernández *et al.*, 2006). Le système b<sup>0,+</sup> est nécessaire à la réabsorption intestinale et rénale des acides aminés dibasiques et de la cystine. La mutation de b<sup>0,+</sup>AT ou de rBAT engendre une cystinurie qui est la forme la plus répandue d'acidoacidurie primaire héréditaire (Calonge *et al.*, 1994; Feliubadaló *et al.*, 1999).

**Tableau X : La sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT appartenant au système b<sup>0,+</sup>**

(Chillarón *et al.*, 1996; Fotiadis *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A9 /b <sup>0,+</sup> AT	SLC3A1 / rBAT / NBAT	acides aminés cationiques, larges acides aminés neutres, cystine	<b>système b<sup>0,+</sup></b> Na <sup>+</sup> indépendant	reins, intestin grêle, foie, placenta

- Chaînes légères HAT non classées dans un système de transport :

Deux sous-familles de protéines SLC7 appartenant au groupe des protéines HAT n'ont pas été classées dans l'un des cinq systèmes de transport précédents (Tableau XI).

**Tableau XI : Les sous-famille de transporteurs SLC7 du groupe des protéines HAT non classées dans un système de transport**(Fernández *et al.*, 2005; Fotiadis *et al.*, 2013; Matsuo *et al.*, 2002)

Nom de la protéine	Chaîne lourde	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC7A13 / AGT1	Non identifiée	acides aminés anioniques (L-Asp, L-Glu)	Na <sup>+</sup> indépendant	reins
Slc7a15 / arpAT	Non identifiée	L-Cystine, L-Arg, L-Ser, L-Gln, L-Ala, forte affinité pour les acides aminés et dérivés d'acides aminés aromatiques (L-Tyr, L-DOPA)		intestin grêle principalement, reins, <b>cerveau</b> (certains neurones)

*c.5) Les transporteurs SLC17*

Parmi les neuf sous-familles appartenant aux transporteurs SLC17, seules trois sous-familles interviennent dans le transport d'acides aminés (Tableau XII). Les six autres sous-familles assurent le transport de différents composés (phosphate, chlorure, anions organiques, acide sialique, nucléotides,...) (Reimer, 2014).

**Tableau XII : Les sous-familles de transporteurs SLC17 impliquées dans le transport d'acides aminés**

(Reimer et Edwards, 2004; Reimer, 2014)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC17A6 / VGLUT2	Glutamate vésiculaire	Cl <sup>-</sup> dépendant	<b>cerveau (neurones)</b>
SLC17A7 / VGLUT1			
SLC17A8 / VGLUT3			<b>cerveau (neurones/cellules gliales)</b> , foie, reins

*c.6) Les transporteurs SLC25*

La famille de transporteurs SLC25 est constituée de cinquante-trois sous-familles de transporteurs mitochondriaux. Ces protéines présentes sur la membrane interne des mitochondries assurent le transport d'une large variété de molécules (métabolites, nucléotides, co-enzymes,...). Les transporteurs de cette famille sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques (cycle de Krebs, dégradation des acides aminés, production de chaleur, lipogénèse, apoptose...) et dans plusieurs maladies (encéphalopathie épileptique infantile précoce, neuropathie démyélinisante progressive,...) (Palmieri, 2008). Cette famille de transporteurs, qui est la plus grande des transporteurs SLC, comporte six sous-familles de transporteurs d'acides aminés (Tableau XIII).

**Tableau XIII : Les sous-familles de transporteurs SLC25 impliquées dans le transport d'acides aminés**  
(Palmieri, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC25A12 / AGC1	Asp, Glu	H <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , cœur, muscles squelettiques, poumons, pancréas, reins
SLC25A13 / AGC2			<b>cerveau</b> , cœur, muscles squelettiques, pancréas, reins, foie
SLC25A2 / ORC2	Lys, Arg, His, ornithine, citrulline	H <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , foie, gonades, rate, poumons, pancréas, intestin grêle, reins
SLC25A15 / ORC1	Lys, Arg, ornithine, citrulline		<b>cerveau</b> , cœur, foie, gonades, rate, poumons, pancréas, intestin grêle, reins
SLC25A18 / GC2	Glu	H <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , cœur, gonades, pancréas, reins, poumons
SLC25A22 / GC1		OH <sup>-</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , cœur, gonades, pancréas, reins, poumons, foie, rate, intestin grêle

### c.7) Les transporteurs SLC32

La famille de transporteurs SLC32 ne comporte qu'une seule sous-famille (Tableau XIV).

**Tableau XIV : La sous-famille de transporteurs SLC32**  
(Schiöth *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC32A1 / VIAAT	GABA et Glycine vésiculaires	H <sup>+</sup> dépendant	<b>système nerveux central</b>

### c.8) Les transporteurs SLC36

La famille de transporteurs SLC36 est constituée de quatre sous-familles (Tableau XV).

**Tableau XV : Les sous-familles de transporteurs SLC36**  
(Schiöth *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC36A1 / PAT1	GABA, Pro, Gly, β-Alanine	H <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , intestin, reins, poumons, foie, rate
SLC36A2 / PAT2	Pro, Gly, Ala, hydroxyproline		poumons, cœur, reins, muscles, gonades, rate, glandes surrénales, thymus, nerf sciatique
SLC36A3 / PAT3			gonades
SLC36A4 / PAT4	Pro, Trp	H <sup>+</sup> dépendant	<b>ubiquitaire</b>

### c.9) Les transporteurs SLC38

La famille de transporteurs SLC38 est constituée de onze sous-familles. Seule la spécificité de transport de six de ces sous-familles a été déterminée (Tableau XVI).

#### Tableau XVI : Les sous-familles de transporteurs SLC38 impliquées dans le transport d'acides aminés

(Mackenzie et Erickson, 2004; Schiöth *et al.*, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC38A1 / SNAT1	Acides aminés neutres (affinité plus forte pour Gln, Ala, Asn, His)	Na <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , rétine, cœur, placenta, glandes surrénales
SLC38A2 / SNAT2			<b>ubiquitaire</b>
SLC38A4 / SNAT4			<b>cerveau</b> , rétine, foie, reins, tissus adipeux
SLC38A7 / SNAT7		<b>cerveau</b> , foie, muscles squelettiques, utérus	
SLC38A3 / SNAT3		Na <sup>+</sup> dépendant	foie, muscles squelettiques, reins, pancréas
SLC38A5 / SNAT5		H <sup>+</sup> dépendant	<b>cerveau</b> , estomac, foie, poumons, intestin, rate, reins

### c.10) Les transporteurs SLC43

La famille de transporteurs SLC43 est constituée de trois sous-familles. Seule la spécificité de transport de deux de ces sous-familles a été déterminée (Tableau XVII). Ces deux sous-familles possèdent une spécificité de transport permettant de les classer parmi les transporteurs du système L (transport sodium-indépendant d'acides aminés neutres, inhibé par le BCH), comme LAT1 (SLC7A5) et LAT2 (SLC7A8). Par contre, LAT3 et LAT4 n'ont pas besoin de chaîne lourde pour permettre leur adressage à la membrane plasmique, à l'inverse de LAT1 et LAT2 (Bodoy *et al.*, 2013).

#### Tableau XVII : Les sous-familles de transporteurs SLC43 impliquées dans le transport d'acides aminés et appartenant au système L

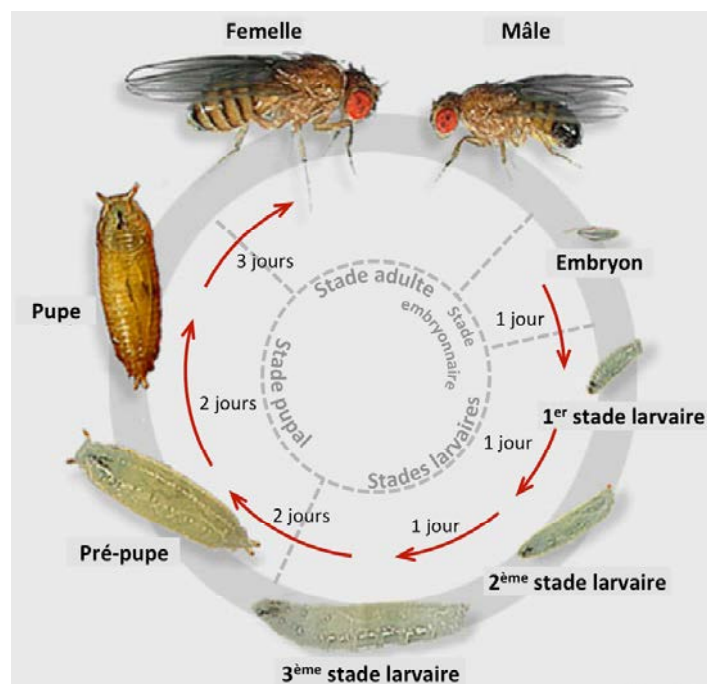
(Babu *et al.*, 2003; Bodoy *et al.*, 2005, 2013)

Nom de la protéine	Substrats	Type de transport	Profil d'expression
SLC43A1 / LAT3	Acides aminés neutres (affinité plus forte pour Leu, Ile, Phe, Val, Met)	<b>système L</b> Na <sup>+</sup> indépendant	foie, muscles squelettiques, placenta, reins
SLC43A2 / LAT4		Cl <sup>-</sup> indépendant Sensible au BCH	placenta, reins, leucocytes, intestin grêle

Comme les acides aminés sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques, le dysfonctionnement des protéines assurant leur transport est associé à plusieurs pathologies, allant de l'aminocidurie aux cancers en passant par différentes maladies nerveuses. L'étude du rôle des transporteurs d'acides aminés semble donc très importante pour avoir une compréhension fine du fonctionnement du système nerveux. Dans ce but, la drosophile permet de réaliser très rapidement et à relativement faible coût des expériences pilotes pour révéler et modéliser l'action de ces transporteurs appartenant aux familles de protéines SLC.

## Partie 2 : Intérêts de la drosophile pour l'étude des HAT dans le système nerveux

La drosophile a été utilisée comme organisme modèle dans les laboratoires depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle. Une quantité importante d'outils génétiques toujours plus sophistiqués ont été développés depuis par les chercheurs et mis à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique. Ces outils facilitent l'étude de la fonction des gènes dans des tissus et cellules spécifiques. De plus, la drosophile est un organisme facile à élever en laboratoire en raison de sa petite taille et de son développement rapide (cycle d'environ 10 jours à 25°C ; Figure 3).



**Figure 3 : Les différents stades du cycle de vie de *Drosophila melanogaster***

Les drosophiles se développent en environ 10 jours à 25°C (<http://igfl.ens-lyon.fr/equipes/f-leulier-functional-genomics-of-host-intestinal-bacteria-interactions/>).

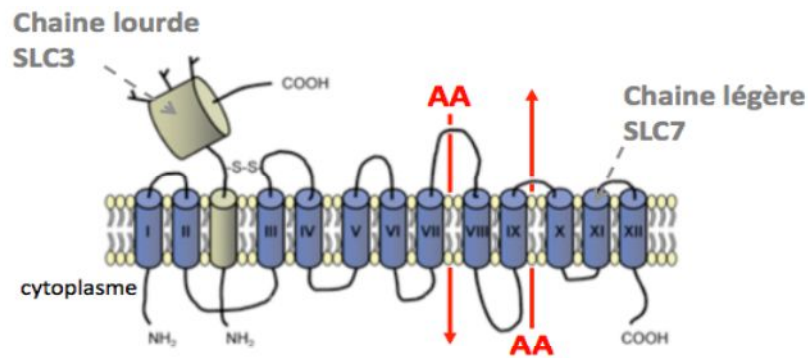
La possibilité d'obtenir des populations de drosophiles comprenant un grand nombre d'individus apporte également une robustesse statistique intéressante. Le génome de la drosophile est entièrement séquencé (Adams *et al.*, 2000) et est composé de 4 chromosomes et d'environ 13 600 gènes. À titre de comparaison, le nombre de gènes estimé dans le génome humain est d'environ 25 000. Plus de 60% des protéines impliquées dans les maladies humaines ont des orthologues chez la drosophile (Rubin *et al.*, 2000). Ce pourcentage est par exemple de 76 % pour les gènes impliqués dans le retard mental (Inlow et Restifo, 2004). Différentes lignées de drosophiles sont notamment utilisées comme modèle d'étude pour certaines maladies neuro-dégénératives telles que la maladie de Huntington, d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la sclérose amyotrophique latérale (Ambegaokar *et al.*, 2010; Iijima et Iijima-Ando, 2008; Rozas *et al.*, 2010).

Dans notre cas, nous cherchons à définir le rôle de transporteurs d'acides aminés dans le fonctionnement du système nerveux par l'étude du comportement. En effet, les comportements bien identifiables de la drosophile (apprentissage, parade, sommeil, ...) permettent de mettre en évidence facilement leurs bases physiologiques, cellulaires et génétiques. De nombreux paradigmes comportementaux ont été développés pour étudier ces différents comportements (Pitman *et al.*, 2009). De plus, la majorité des transporteurs codés par le génome de drosophile sont semblables aux types de transporteurs codés par le génome humain, ce qui est par exemple le cas des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés (HAT) (Featherstone, 2011). La drosophile est donc un modèle neurogénétique particulièrement adapté pour ce type de recherche.

#### a) Conformation des protéines HAT de mammifères et de drosophiles

Les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés HAT sont constitués d'une chaîne légère de la famille SLC7 et d'une chaîne lourde de la famille SLC3. Chez les mammifères, la chaîne légère, responsable du transport et de la spécificité de substrat, confère à ce complexe hétérodimérique son rôle d'échangeur d'acides aminés. La chaîne lourde rend quant à elle ce complexe fonctionnel en permettant son adressage à la membrane plasmique (Figure 4 ; Verrey *et al.*, 2004). La chaîne légère est une protéine membranaire non glycosylée hautement hydrophobe d'environ 50 kDa, composée de 12 domaines transmembranaires avec les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH situées au niveau intracellulaire. La chaîne lourde est une protéine membranaire glycosylée d'environ 90 kDa, composée d'un domaine NH<sub>2</sub>-terminale intracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine COOH-terminale extracellulaire (Palacín *et al.*, 2005).





**Figure 4 : Structure schématique des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés**

Les échangeurs d'acides aminés HAT sont constitués d'une chaîne lourde SLC3 permettant l'adressage du complexe protéique à la membrane plasmique et d'une chaîne légère SLC7 impliquée dans la spécificité de transport ; AA : Acides Aminés (modifié d'après Verrey *et al.*, 2004).

Ces deux chaînes protéiques sont liées entre elles par un pont disulfure. Les résidus cystéine impliqués dans cette liaison sont localisés au niveau de la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire de la chaîne légère et à proximité (4 à 5 acides aminés) du domaine transmembranaire de la chaîne lourde (Palacín *et al.*, 2005). La séquence et la structure du domaine extracellulaire de la chaîne lourde SLC3 présentent une forte homologie avec les Maltases d'insectes et les  $\alpha$ -Glucosidases de bactéries, qui sont des enzymes catalysant l'hydrolyse du maltose et des dextrines en glucose (Fort *et al.*, 2007; Gabriško et Janeček, 2009). Cependant, malgré ces similarités, les protéines SLC3 ne possèdent pas le résidu catalytique nécessaire à l'activité enzymatique des Maltases et des  $\alpha$ -Glucosidases (Fort *et al.*, 2007). Par ailleurs, la chaîne lourde 4F2hc de mammifères (SLC3A2) est connue pour être impliquée dans la signalisation des  $\beta$ -Intégrines ainsi que dans la fusion et la prolifération cellulaire (Fotiadis *et al.*, 2013).

Comme nous l'avons vu dans la Partie 1 de l'introduction, deux chaînes lourdes SLC3 (Tableau III) et dix chaînes légères SLC7 (Tableau VI à Tableau XI) ont été identifiées chez les mammifères (Fotiadis *et al.*, 2013).

Chez la drosophile, une seule chaîne lourde et cinq chaînes légères homologues des protéines HAT de mammifères ont pu être identifiés (Augustin *et al.*, 2007; Featherstone, 2011). La simple comparaison des pourcentages de similarité de séquences entre les protéines HAT de drosophiles et de mammifères ne permet pas de déterminer à quel système de transport (système L, système  $x_c^-$ , ...) les transporteurs HAT de drosophiles appartiennent. En effet, chaque protéine HAT de drosophile présente une forte similarité de séquence (de l'ordre de 50%) avec plusieurs protéines HAT de mammifères appartenant à des systèmes de transport différents. Seule l'étude des caractéristiques (fonctions, spécificité de transport, ...) des protéines HAT de drosophiles peut donner des indications sur le système de transport auquel elles appartiennent.

## b) Les protéines HAT identifiées chez *Drosophila melanogaster*

### b.1) Chaîne lourde : CD98 heavy chain (CD98hc)

Les expériences menées par Reynolds et collaborateurs montrent que le transport de leucine dans les cellules S2 de drosophiles en culture est sodium-indépendant et est inhibé par le BCH. Ces résultats indiquent que le transport de la leucine dans les cellules S2 est assuré par des transporteurs du système L. Ces expériences ont également démontré que ce transport implique deux chaînes légères de drosophiles (JhI-21 et Mnd) ainsi qu'un orthologue fonctionnel de la chaîne lourde CD98hc de mammifère, également nommé CD98hc et fonctionnant avec JhI-21 (Reynolds *et al.*, 2009).

Les travaux menés par Flora Sourdot au sein de l'équipe ont montré que CD98hc est exprimé dans le système nerveux central de la drosophile et que cette chaîne lourde est impliquée dans la perception olfactive des drosophiles (Sourdot, 2014 Rapport de stage de Master 2 Recherche).

### b.2) Chaînes légères

#### b.2.1) Minidisks (Mnd)

Mnd (Minidisks) a d'abord été décrit pour son rôle dans le tissu adipeux de la drosophile où il est fortement exprimé (Martin *et al.*, 2000). En effet, Mnd permettrait l'apport d'acides aminés nécessaires à la synthèse d'un facteur diffusible hypothétique par le tissu adipeux. La sécrétion de ce facteur dans l'hémolymphe permettrait la prolifération cellulaire des disques imaginaux. Chez les mutants *mnd*, ce facteur ne serait ni synthétisé, ni secrété ce qui provoque une prolifération cellulaire déficiente et mène au phénotype « mini disques imaginaux » de ces mutants. Pour obtenir ces mutants, Martin et collaborateurs ont réalisé une mutagenèse chimique en utilisant du méthanesulfonate d'éthyle (EMS). Cette technique a pour effet de créer des allèles plus ou moins forts qui conduisent dans le cas de *mnd* à une létalité, soit au stade embryonnaire (pour les allèles les plus forts), soit au 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> stade larvaire, soit juste après la formation de la puppe, soit à l'émergence (Martin *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les cerveaux de larves mutantes pour *mnd* présentent un ganglion ventral légèrement plus petit (80-90%) que les témoins ainsi qu'une réduction sévère de la taille des lobes du cerveau (moins de 50% du diamètre des lobes par rapport aux témoins). Mnd semble donc être important pour le développement de la drosophile et de son système nerveux (Martin *et al.*, 2000).

Il a par ailleurs été démontré en culture cellulaire que Mnd permet le transport de la leucine et semblerait appartenir aux transporteurs du système L (Reynolds *et al.*, 2009). De

plus, Mnd est également exprimé dans les cellules productrices d'insuline de la Pars Intercerebralis (cellules appartenant au système neuroendocrinien des insectes) des cerveaux de larves et permet la sécrétion d'insuline en présence de leucine (Manière *et al.*, en préparation).

### *b.2.2) Genderblind (Gb)*

Gb semble être un homologue de l'antiport cystine/glutamate SLC7A11 de mammifères (système  $x_c^-$ ) (Augustin *et al.*, 2007). L'expression de *gb* au niveau du système nerveux de drosophile semble être limitée aux cellules gliales des jonctions neuromusculaires (synapse glutamatergique modèle chez la drosophile) et dans certaines cellules gliales du système nerveux central (Augustin *et al.*, 2007). Chez l'adulte, les cellules gliales exprimant *gb* sont notamment présentes au niveau des centres nerveux intégratifs olfactifs (lobes antennaires, calices) et gustatifs (ganglion sous-œsophagien) des drosophiles (Grosjean *et al.*, 2008).

La mutation de *gb* (par insertion d'un transposon) provoque une diminution de la quantité de glutamate extracellulaire mesurable dans l'hémolymphe des larves (Augustin *et al.*, 2007; Piyankarage *et al.*, 2008). Cette diminution de la concentration de glutamate extracellulaire entraîne une augmentation du regroupement des récepteurs au glutamate sur les zones post-synaptiques des jonctions neuromusculaires (Augustin *et al.*, 2007). Chez l'adulte, la mutation de *gb* entraîne une forte parade entre mâles, ce qui semble au moins en partie dû à une perturbation de la réponse olfactive et gustative vis à vis de phéromones répulsives (produites par les drosophiles mâles) qui deviennent attractives. Par ailleurs, cette baisse de la concentration de glutamate extracellulaire semble également exacerber l'attraction des drosophiles pour certaines molécules attractives, les drosophiles mutées pour *gb* étant attirées plus rapidement que les témoins par une odeur de nourriture. Le maintien de la concentration de glutamate par les cellules gliales exprimant Gb pourrait donc avoir un rôle clé dans le contrôle de l'activité neuronale chimiosensorielle (Grosjean *et al.*, 2008).

### *b.2.3) Juvenile hormone Inducible-21 (Jhl-21)*

*Jhl-21 (Juvenile hormone Inducible-21)* a initialement été identifié dans un crible de gènes dont l'expression est induite par l'hormone juvénile (Dubrovsky *et al.*, 2002). La présence de cette hormone lors de la mue des larves empêche leur entrée en phase pupale, ce qui a pour effet de maintenir les caractéristiques morphologiques juvéniles de la larve (Riddiford *et al.*, 2010).

Il a été démontré que Jhl-21 forme un hétérodimère avec CD98hc et que ce complexe permet le transport de la leucine et semble appartenir au système L (Reynolds *et al.*, 2009). Contrairement à Gb, Jhl-21 est présent dans les neurones et non dans les cellules gliales. Cependant, de façon similaire à *gb*, la mutation de *Jhl-21* (par insertion d'un transposon) engendre une forte agglomération des récepteurs au glutamate à la jonction neuromusculaire des larves (Ziegler *et al.*, en révision). La mutation de *Jhl-21* entraîne également un changement du comportement locomoteur de la larve (Ziegler *et al.*, en révision). Paradoxalement, aucun changement de la concentration en glutamate extracellulaire n'a pu être observé chez ces mutants (Piyankarage *et al.*, 2010).

L'expression de *Jhl-21* a également été détectée dans les cellules productrices d'insuline de la Pars Intercerebralis dans des cerveaux de larve. Jhl-21 intervient dans la voie de signalisation cellulaire conduisant à la sécrétion d'insuline lorsque les larves s'alimentent (Ziegler *et al.*, en préparation).

#### *b.2.4) CG1607 et CG9413*

CG1607 et CG9413 n'ont pour l'instant fait l'objet d'aucune publication. Cependant, les travaux menés au sein de l'équipe indiquent que, comme Mnd, ces deux protéines interviennent dans le développement de la drosophile (Galagovsky *et al.*, en préparation).

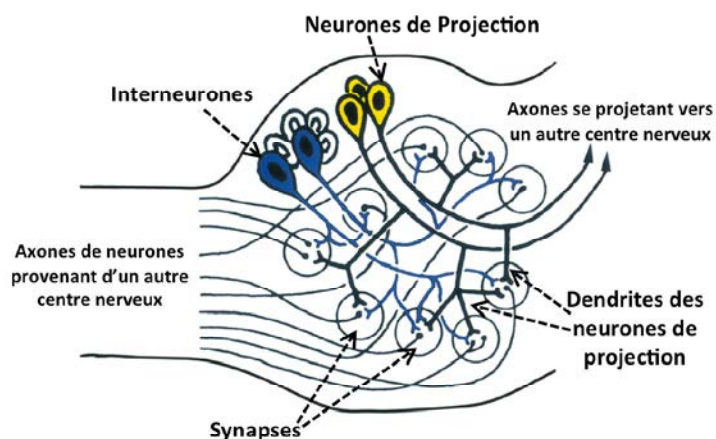
Les similitudes existant entre les protéines HAT de mammifères et de drosophiles permettent d'étudier le rôle de ces transporteurs dans le fonctionnement du système nerveux en utilisant la drosophile comme organisme modèle. De plus, la drosophile est d'autant plus adaptée à ce type de recherche que son système nerveux, tout en étant relativement simple, présente de nombreuses analogies avec le système nerveux de mammifère.

#### **c) Comparaison des systèmes nerveux de mammifères et de drosophiles**

Avec environ 100 000 neurones, le système nerveux de la drosophile compte près d'un million de fois moins de neurones que le cerveau humain, contenant pour sa part environ 100 milliards de neurones (O'Kane, 2011). Bien que d'importantes différences existent en terme de complexité et de structure du cerveau, de nombreuses similarités peuvent être observées entre les systèmes nerveux d'insectes et de mammifères, que ce soit au niveau de la transmission synaptique ou au niveau de l'organisation des neurones et des cellules gliales.

### c.1) Les neurones

Alors que les neurones de mammifères sont majoritairement bipolaires et organisés en couches synaptiques successives, les neurones d'insectes sont quant à eux majoritairement unipolaires et organisés en régions ganglionnaires synaptiques appelées neuropiles (Parker *et al.*, 2011). Les neuropiles désignent les régions du cerveau des insectes où se forment les synapses entre dendrites et axones ; les corps cellulaires des neurones étant principalement présents en périphérie de ces régions (Figure 5).

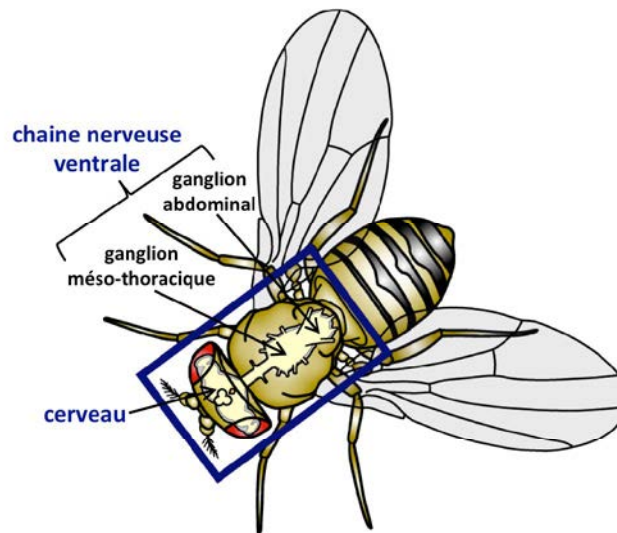


**Figure 5 : Représentation schématique d'un neuropile de drosophile**

L'arrangement entre neurones dans les structures nerveuses forme des neuropiles. Les corps cellulaires des différents neurones sont en périphérie au niveau du cortex tandis que les neuropiles sont les zones où s'établissent les synapses entre axones et dendrites (modifié d'après Bicker, 1998).

Les similarités entre neurones d'insectes et de mammifères se retrouvent au niveau de l'organisation membranaire des neurones. Des homologues des pompes ioniques et des canaux voltage- ou ligand-dépendants permettant la propagation de potentiels d'action chez les mammifères sont présents chez la drosophile. De la même façon, les mécanismes permettant la formation de vésicule synaptiques, la libération et le recyclage des neurotransmetteurs ainsi que la présence de récepteurs post-synaptiques aux neurotransmetteurs sont également des caractéristiques communes (O'Kane, 2011; Parker *et al.*, 2011). Les principaux neurotransmetteurs sont également communs aux mammifères et aux drosophiles, tels que les systèmes glutamatergiques (le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur chez les mammifères), GABAergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques, cholinergiques (l'acétylcholine est le principal neurotransmetteur excitateur chez les insectes) ou encore histaminergiques. Par ailleurs, l'octopamine et la tyramine des insectes sont des homologues putatifs des neurotransmetteurs adrénergiques de mammifères (adrénaline et noradrénaline) (Littleton et Ganetzky, 2000; O'Kane, 2011).

Comme le système nerveux central des mammifères, qui est constitué de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et de la moelle épinière, le système nerveux central des drosophiles est composé de deux parties : le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale, qui sont reliées au système nerveux périphérique (neurones sensoriels, neurones moteurs,...) (Figure 6).



**Figure 6 : Le système nerveux central chez la drosophile adulte (vue dorsale)**

Le système nerveux central de la drosophile est composé du cerveau (situé dans la capsule céphalique) et de la chaîne nerveuse ventrale (située dans le thorax et l'abdomen) (modifié d'après Sánchez-Soriano *et al.*, 2007).

Le cerveau des drosophiles est composé de plusieurs centres nerveux dont la plupart sont bien décrits, tels que les lobes optiques, le ganglion sous-œsophagien, les lobes antennaires, les corps pédonculés ou encore le complexe central (Figure 7).



**Figure 7 : Représentation schématisique du cerveau de drosophile dans la capsule céphalique**

Les principaux centres nerveux de la drosophile sont représentés en fausses couleurs : vert= lobes optiques ; jaune= ganglion sous-œsophagien ; rouge= lobes antennaires ; bleu= corps pédonculés ; orange= complexe central ; turquoise= autres structures nerveuses non détaillées (Heisenberg, 2003).

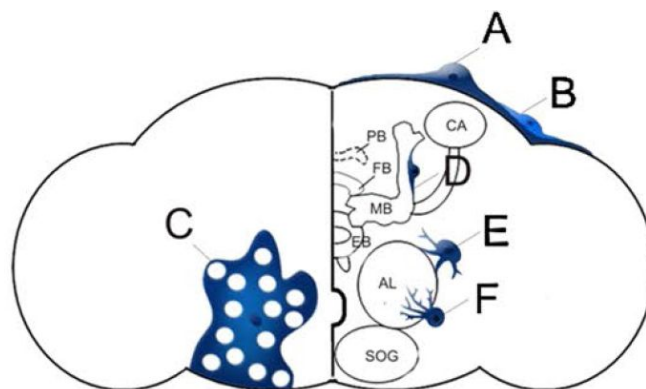
### c.2) Les cellules gliales

Alors que les cellules gliales représenteraient 50 à 90% des cellules du cerveau humain, ces cellules ne représenteraient que 10 à 25% des cellules du cerveau des insectes (Edwards et Meinertzhagen, 2010). Chez les mammifères, les extensions cytoplasmiques engendrées par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann autour des axones forment des gaines de myéline permettant d'augmenter la vitesse de propagation des messages nerveux. Cette relation entre cellules gliales et axones est similaire chez la drosophile bien que les cellules gliales d'insectes ne produisent pas de gaines de myéline. En effet, le génome de drosophile ne possède pas d'homologue de la plupart des gènes liés à la production des gaines de myéline (Freeman et Doherty, 2006). Cependant, les cellules gliales de drosophiles forment des extensions cytoplasmiques aplaties s'enroulant en plusieurs couches autour des axones qui sont morphologiquement similaires aux gaines de myéline de mammifères. De plus, les cellules gliales de drosophiles expriment la Neurexine qui est une protéine de jonction nécessaire au processus de myélinisation chez les vertébrés (Edwards et Meinertzhagen, 2010).

D'autre part, comme les oligodendrocytes et les astrocytes de mammifères, les cellules gliales d'insectes sont impliquées respectivement dans le guidage des axones lors du développement et dans le recyclage des neurotransmetteurs chez l'adulte (Freeman et Doherty, 2006; Parker et Auld, 2006). Les cellules gliales d'insectes et de mammifères jouent ainsi un rôle important dans la formation, la plasticité et l'élimination des synapses mais également dans la modulation de l'activité synaptique elle-même (Eroglu et Barres, 2010; Haydon, 2001). Il a été démontré que la libération de neurotransmetteurs par les neurones pré-synaptiques induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire pour les cellules gliales entourant les synapses. Les cellules gliales ainsi activées libèrent alors différentes molécules neuro-actives dans la fente synaptique, telles que l'ATP, la D-sérine ou le glutamate. Ces molécules peuvent à leur tour activer ou réprimer la libération de neurotransmetteurs par les neurones pré-synaptiques ou encore stimuler ou inhiber directement les neurones post-synaptiques (Newman, 2003). En modulant l'activité neuronale, les cellules gliales peuvent par exemple modifier certains comportements (comme le sommeil ou l'activité locomotrice), ce qui a pu être mis en évidence chez le mammifère (Halassa et Haydon, 2010; Kettenmann *et al.*, 2013) comme chez la drosophile (Zwarts *et al.*, 2014).

Chez la drosophile, il existe six types de cellules gliales répartis en trois catégories (Figure 8; Edwards et Meinertzhagen, 2010; Zwarts *et al.*, 2014):

- les cellules gliales de surface, qui forment des extensions cytoplasmiques aplaties entourant le cerveau de drosophile. Ces cellules constituent la couche externe de la barrière hémato-encéphalique qui isole le système nerveux de l'hémolymphe présente dans le système circulatoire ouvert des insectes. Deux types de cellules gliales appartiennent à cette catégorie : les cellules gliales périneurales (apicales ; Figure 8B) et sous-périneurales (basales; Figure 8A) ;
- les cellules gliales du cortex (Figure 8C), étroitement associées à la barrière hémato-encéphalique, entourent pour chacune d'elles le corps cellulaire de plusieurs neurones. Ces cellules forment une sorte de maille dans le cortex du système nerveux central de drosophile ;
- les cellules gliales associées aux neuropiles sont situées à l'interface entre le cortex et les neuropiles. Trois types de cellules gliales appartiennent à cette catégorie : les cellules gliales enveloppantes (qui forment des extensions cytoplasmiques aplaties autour des regroupements d'axones ; Figure 8D) ; les cellules gliales engainantes (qui forment des extensions cytoplasmiques autour des neuropiles ; Figure 8E) et les cellules gliales semblables aux astrocytes (qui forment des extensions cytoplasmiques s'infiltrant dans les neuropiles ; Figure 8F).



**Figure 8 : Les différents types de cellules gliales du cerveau de drosophile**

A: Glie sous-périneurale ; B: Glie périneurale ; C: Glie corticale ; D: Glie enveloppante ; E: Glie engainante ; F: Glie « astrocyte-like » ; (SOG : Ganglion sous-œsophagien ; AL : Lobe antennaire ; MB : Corps Pédonculés ; EB : Corps Ellipsoïde ; FB : Corps en éventail ; PB : Pont protocérébral ; CA : Calice) (Zwarts *et al.*, 2014).

Les similarités existant entre les systèmes nerveux de drosophiles et de mammifères sont autant d'arguments démontrant l'intérêt de la drosophile comme organisme modèle pour l'étude du fonctionnement du système nerveux.

Les structures nerveuses à l'origine d'un comportement sont particulièrement bien décrites chez la drosophile. L'étude du comportement permet donc d'obtenir des indications quant au rôle d'une protéine dans le fonctionnement du système nerveux. Dans



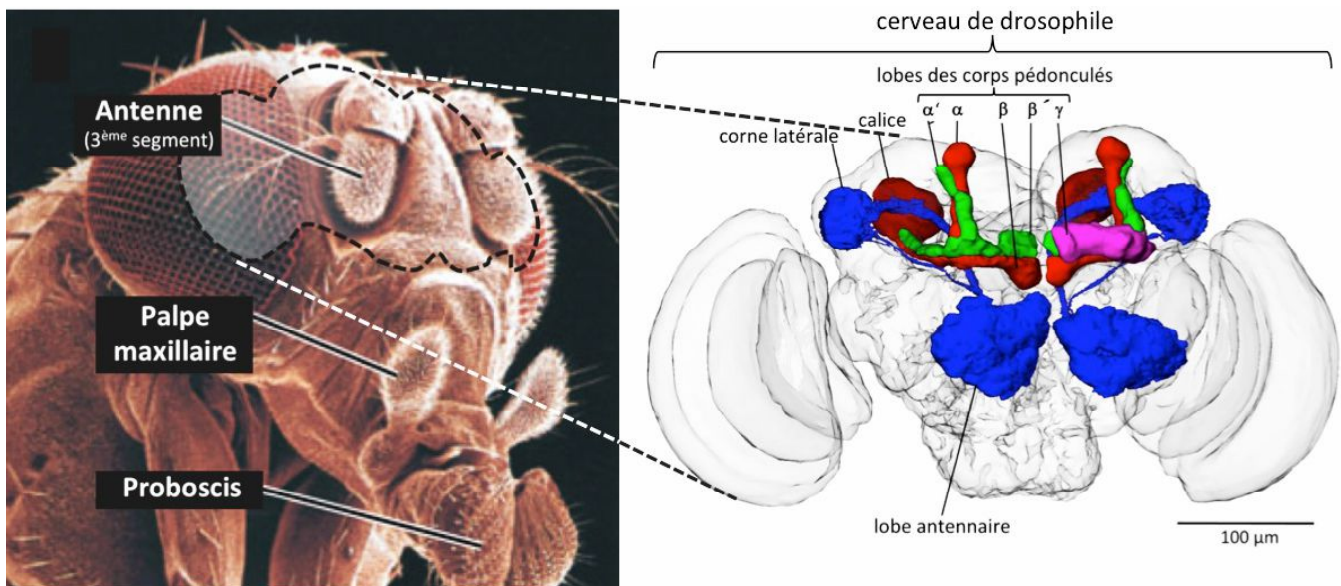
l'équipe « Perception Sensorielle, Interactions Glie/Neurones » dirigée par le Dr. Grosjean, nous travaillons plus particulièrement sur les comportements en lien avec l'intégration des signaux chimiosensoriels notamment olfactifs.

### Partie 3 : Intégration des informations par le système nerveux de drosophile et réponse comportementale

#### a) La perception sensorielle olfactive

Les comportements en lien avec la perception olfactive sont particulièrement intéressants à étudier dans la mesure où les systèmes nerveux olfactifs de mammifères et de drosophiles présentent de nombreuses similitudes structurelles et fonctionnelles, même s'il existe des différences.

Alors que la plupart des neurones sensoriels olfactifs de mammifères ( $\approx 2\,000\,000$  chez la souris) sont situés au niveau de l'épithélium olfactif qui tapisse la cavité nasale et de structures morphologiques à proximité (organe voméronasal, organe septal, organe de Grüneberg), ceux de drosophiles ( $\approx 1\,300$ ) sont abrités dans des sensilles situées sur le troisième segment des antennes et sur les palpes maxillaires (Vosshall et Stocker, 2007) (Figure 9).



**Figure 9 : Organisation anatomique du système nerveux olfactif de la drosophile**

Les neurones olfactifs de drosophiles sont localisés au niveau des antennes et des palpes maxillaires et projettent leur axone au niveau des lobes antennaires. Ils établissent alors des synapses avec des neurones secondaires projetant leur axone dans les calices des corps pédonculés et les cornes latérales. Les centres nerveux impliqués dans le traitement de l'information olfactive sont représentés en fausses couleurs : bleu : lobes antennaires et cornes latérales ; rouge : calices et lobes  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés ; vert : lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés ; rose : lobes  $\gamma$  des corps pédonculés (modifié d'après Vosshall et Stocker, 2007 et Waddell, 2011).

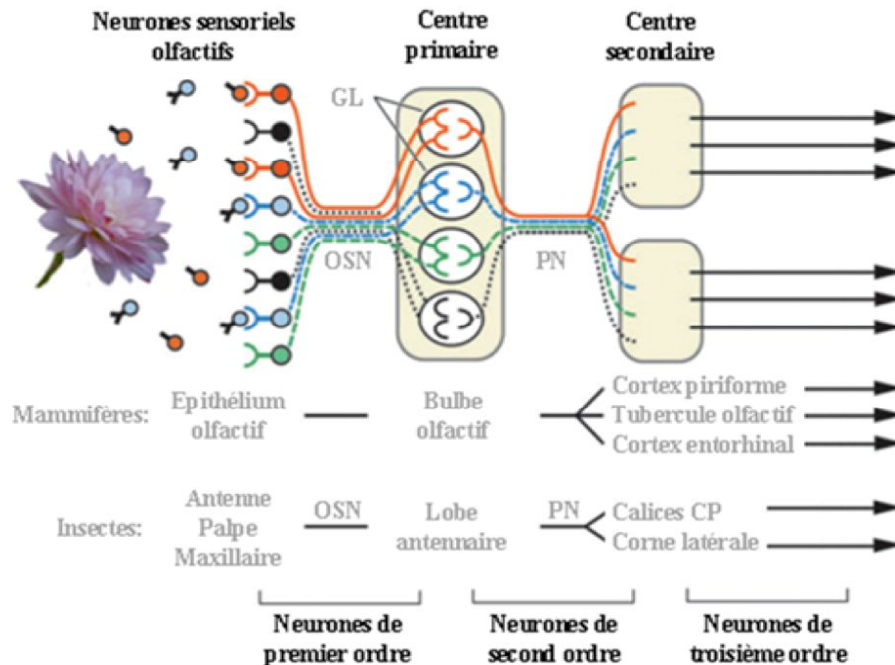
Dans les deux cas, des récepteurs olfactifs capables de reconnaître différentes molécules volatiles olfactives sont localisés au niveau des dendrites de ces neurones olfactifs. Tous les récepteurs olfactifs de mammifères ( $\approx 1\ 200\ 000$  chez la souris) connus à ce jour appartiennent à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) à sept domaines transmembranaires (Spehr et Munger, 2009). Chez la drosophile, deux familles de récepteurs olfactifs ont été décrits: les récepteurs olfactifs (OR; 62 au total) à sept domaines transmembranaires mais ne possédant pas d'homologie avec les GPCR (Vosshall et Stocker, 2007; Vosshall *et al.*, 1999) et les récepteurs ionotropiques (IR; 15 au total) (Benton *et al.*, 2009).

Les OR d'insectes fonctionnent comme des canaux ioniques odorants-dépendants (Sato *et al.*, 2008) et leur topologie inversée par rapport aux OR de mammifères exclurait un rôle direct des protéines G (Benton *et al.*, 2006). Un membre de la famille des OR, Orco (aussi appelé Or83b), est un corécepteur obligatoire chez les insectes (Larsson *et al.*, 2004). Orco s'associe dans un neurone olfactif donné avec un deuxième OR spécifique (responsables de la spécificité de liaison au ligand), ce qui contraste en partie avec la règle «un neurone pour un récepteur» établie chez les vertébrés (Vosshall et Stocker, 2007).

Les IR appartiennent à la même famille que les récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluR) mais ne possèdent pas le résidu permettant la liaison au glutamate au niveau du domaine de fixation du ligand (Benton *et al.*, 2009). Le domaine de fixation du ligand est très variable d'un IR à l'autre et permettrait ainsi la reconnaissance de différentes molécules olfactives autres que le glutamate (Benton *et al.*, 2009). Les IR fonctionnent également comme des canaux ioniques odorants-dépendants associant généralement un IR corécepteur comme IR25a ou IR8a et un IR assurant la spécificité de liaison au ligand (Abuin *et al.*, 2011). Les neurones olfactifs peuvent exprimer de deux à quatre gènes différents codant pour des IR (Benton *et al.*, 2009).

Malgré ces différences morphologiques et moléculaires, les systèmes olfactifs de mammifères et d'insectes présentent de nombreuses similarités neuro-anatomique (Figure 10). En effet, dans les deux cas, tous les neurones olfactifs exprimant le même récepteur olfactif spécifique projettent leur axone dans un même glomérule ( $\approx 50$  chez la drosophile,  $\approx 1\ 800$  chez la souris) du centre olfactif primaire, appelé lobe antennaire chez les insectes ou bulbe olfactif chez les mammifères. Dans ces glomérules, les neurones olfactifs établissent des synapses avec deux types de neurones secondaires: les neurones de projection et les interneurons chez les insectes; les cellules mitrales et les neurones périglomérulaires chez les mammifères.

Chez les insectes, les neurones de projection envoient alors leur axone via un nerf appelé tractus antennaire cérébral vers deux centres olfactifs secondaires: les corps pédonculés et les cornes latérales (Figure 9) (Spehr et Munger, 2009; Vosshall et Stocker, 2007).



**Figure 10 : Parallèle entre les structures neuro-anatomiques servant au codage de l'information olfactive chez les insectes et les mammifères**

Les neurones olfactifs exprimant les mêmes récepteurs projettent leur axone dans un même glomérule du centre primaire olfactif appelé bulbe olfactif chez les mammifères et lobe antennaire chez les insectes. Puis les neurones sensoriels établissent des synapses avec des neurones de projection qui vont cibler différents centres olfactifs secondaires. PN : neurone de projection, OSN : neurone sensoriel olfactif, GL : glomérule, CP : corps pédonculés (modifié d'après Vosshall et Stocker, 2007).

Les corps pédonculés sont principalement étudiés pour leur rôle dans l'apprentissage et la mémoire olfactive (Busto *et al.*, 2010). Cependant, les corps pédonculés sont également connus pour être impliqués dans la parade sexuelle (Mehren *et al.*, 2004), la locomotion (Serway *et al.*, 2009) ou encore le sommeil (Bushey et Cirelli, 2011). Alors que la majeure partie des informations sensorielles reçues par les corps pédonculés sont des informations olfactives provenant des lobes antennaires, cette structure reçoit également des informations visuelles, gustatives, mécanosensorielles et proprioceptives (Farris, 2011).

Bien moins étudiées que les corps pédonculés, les cornes latérales seraient quant à elles impliquées dans la réponse innée aux odeurs et aux phéromones (Jefferis *et al.*, 2007). La corne latérale serait donc un centre d'intégration des informations olfactives (valence hédonique, intensité) permettant une réponse comportementale appropriée (attraction,

répulsion, parade,...) (Strutz *et al.*, 2014).

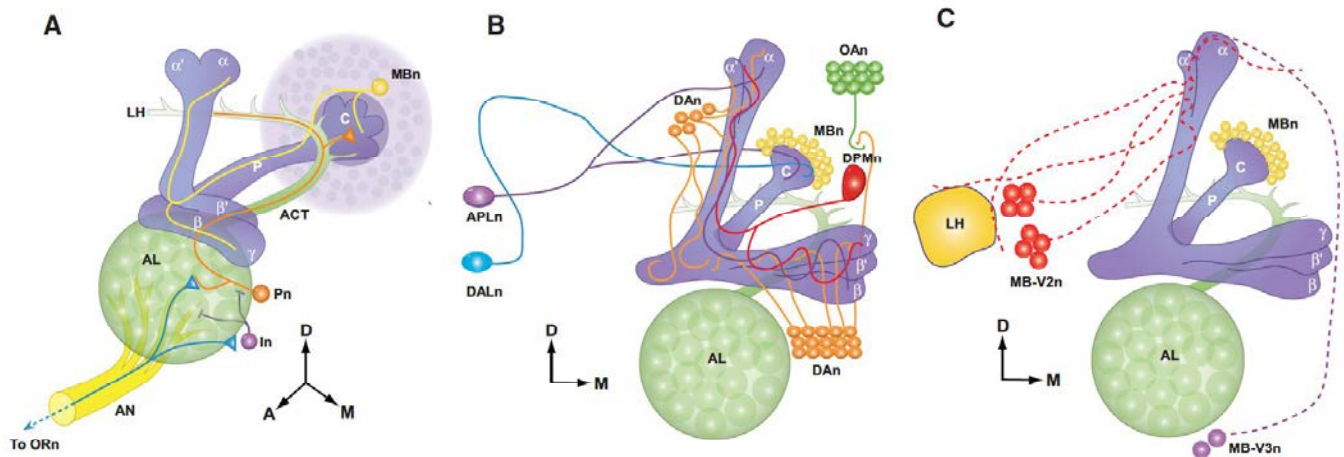
Les capacités olfactives des drosophiles (capacité de détection puis d'intégration d'une odeur attractive ou répulsive) peuvent être évaluées grâce à des tests comportementaux de choix olfactif, tels que les tests en Y (*cf.* Partie 6-a du matériel et méthodes) (Simonnet *et al.*, 2014). Ces tests permettent notamment d'évaluer l'implication d'une protéine (telle que les transporteurs d'acides aminés) dans la perception olfactive. D'autres paradigmes comportementaux permettent quant à eux d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémorisation des drosophiles en réponse à une odeur.

### b) L'apprentissage et la mémoire olfactive

Les corps pédonculés sont des structures nerveuses nécessaires à l'apprentissage et à la mémorisation chez la drosophile. Les neurones de projection provenant des lobes antennaires forment des synapses avec les neurones des corps pédonculés (aussi appelés cellules de Kenyon) au niveau des calices. Les axones des cellules de Kenyon forment le pédoncule et les différents lobes des corps pédonculés ( $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\gamma$ ) (Figure 9 et Figure 11A ; Davis, 2011; Waddell, 2011).

Dans le cadre des études concernant le rôle des corps pédonculés dans l'apprentissage et la mémoire olfactive, des fonctions différentes semblent pouvoir être attribuées à chacun des lobes qui composent cette structure nerveuse :

- Les neurones formant les lobes  $\gamma$  des corps pédonculés semblent être impliqués dans le processus d'acquisition et de restitution de la mémoire à court terme (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2013). Le conditionnement olfactif classique (conditionnement Pavlovien) nécessite qu'une mouche associe une odeur neutre utilisée comme stimulus conditionné (CS) avec un stimulus non conditionné (US) (Quinn *et al.*, 1974). Les neurones formant les lobes  $\gamma$  semblent être notamment impliqués, au moins en partie, dans la détection de la coïncidence temporelle entre stimulus conditionné et non-conditionné lors de l'apprentissage (Qin *et al.*, 2012).
- Les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés semblent être principalement impliqués dans la mémoire à court et moyen terme (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2013; Davis, 2011).
- Les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  sont quant à eux impliqués dans toutes les formes temporelles de mémoire et semblent être particulièrement indispensables à la mémoire à long terme (Cervantes-Sandoval *et al.*, 2013).



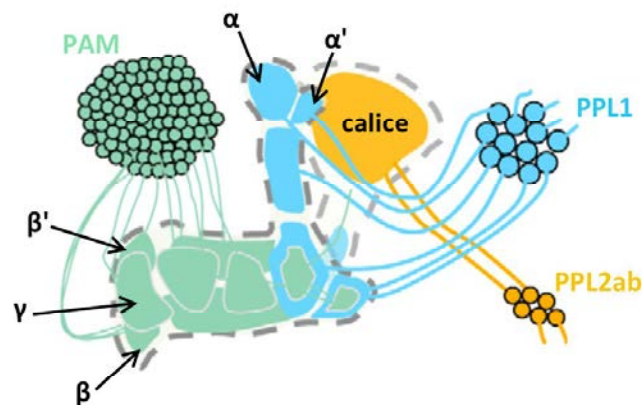
**Figure 11 : Représentation des différentes catégories de neurones impliqués dans la transmission du signal olfactif et dans l'apprentissage et la mémoire**

A) Vue d'ensemble des neurones impliqués dans la transmission du signal olfactif B) Neurones afférents aux corps pédonculés impliqués dans l'apprentissage et la mémoire C) Neurones efférents aux corps pédonculés impliqués dans le rappel de la mémoire (n : neurones ; OR : Récepteurs Olfactifs ; AN : nerf antennaire ; AL : Lobe antennaire ; In : Inter-neurones ; Pn : neurones de Projection ; ACT : Tractus Antennaire Cérébral ; P : Pédoncule ; C : Calice ; MB : Corps Pédonculés ; LH : Corne Latérale ; DPMn : neurones appariés dorso-médians ; APLn : neurones appariés latéraux antérieurs ; DAn : neurones Dopaminergiques ; OAn : neurones Octopaminergiques ; DALn : neurones latéraux dorso-antérieurs ; MB-V2n et MB-V3n : neurones ventraux liés aux corps pédonculés de type 2 et 3 ; Axes: A=anterior, D=dorsal, M=médial) (Guyen-Ozkan et Davis, 2014).

Quatre classes de neurones afférents aux corps pédonculés, également connus pour être impliqués dans la mémoire et l'apprentissage, innervent les neurones de cette structure nerveuse (Figure 11B ; Guven-Ozkan et Davis, 2014) :

- les neurones appariés dorso-médians (DPMn), qui innervent les lobes verticaux ( $\alpha$  et  $\alpha'$ ) et horizontaux ( $\beta$ ,  $\beta'$ , et  $\gamma$ ) des corps pédonculés, semblent être impliqués dans la consolidation de la mémoire (Keene *et al.*, 2004);
- les neurones appariés latéraux antérieurs (APLn), qui innervent les calices et les lobes des corps pédonculés, exercent un effet inhibiteur sur les neurones des corps pédonculés. Lors de l'apprentissage, les neurones des corps pédonculés bloquent à leur tour l'effet inhibiteur des neurones APL, ce qui semble améliorer l'acquisition et la stabilité de la mémoire (Liu et Davis, 2009);
- les neurones latéraux dorso-antérieurs (DALn), qui innervent une région des calices abritant les dendrites des neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  des corps pédonculés, semblent être impliqués dans le stockage et la restitution de la mémoire à long terme (Chen *et al.*, 2012);
- les neurones dopaminergiques (DAn), qui innervent différentes aires du cerveau et dont trois groupes innervent les neurones des corps pédonculés : les neurones PAM (lobes horizontaux ( $\beta$ ,  $\beta'$ , et  $\gamma$ )), les neurones PPL1 (lobes verticaux ( $\alpha$  et  $\alpha'$ )) et les

neurones PPL2ab (calices) (Figure 12). C'est au travers des neurones dopaminergiques que les corps pédonculés recevraient les informations transmises par les neurones octopaminergiques (OAn) (Figure 11B). Les neurones dopaminergiques seraient directement impliqués dans le renforcement de la mémoire aversive, mais auraient également un rôle dans le renforcement de la mémoire appétitive au travers des connexions avec le système octopaminergique (Güven-Ozkan et Davis, 2014).

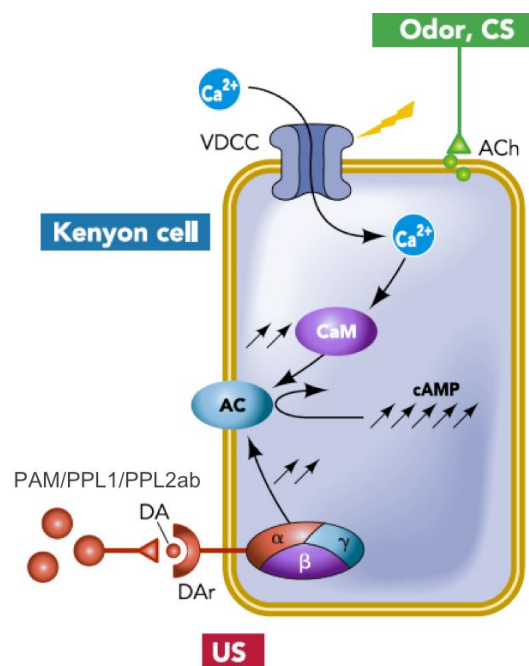


**Figure 12 : Représentation schématique des trois groupes de neurones dopaminergiques afférents aux corps pédonculés**

Les neurones dopaminergiques PPL1 (bleu) innervent les lobes verticaux des corps pédonculés ( $\alpha$  et  $\alpha'$ ), les neurones PAM innervent les lobes horizontaux ( $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\gamma$ ) et les neurones PPL2ab innervent les calices (modifié d'après Aso *et al.*, 2012).

Les neurones dopaminergiques semblent être impliqués dans la détection de la coïncidence temporelle entre stimulus conditionné et stimulus non-conditionné (aversif ou appétitif) lors du processus d'apprentissage (Busto *et al.*, 2010). Lors de l'apprentissage, l'information apportée par le stimulus conditionné (CS) est acheminée aux cellules de Kenyon par les neurones de projection. Les neurones de projection libèrent de l'acétylcholine au niveau de la synapse avec les cellules de Kenyon, ce qui provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire provoque une augmentation du nombre de Calmodulines liées avec une molécule de calcium. La Calmoduline liée au calcium active alors l'adénylate cyclase qui synthétise de l'AMPc (Figure 13). L'information apportée par le stimulus non conditionné (US) permet la libération de dopamine par les neurones dopaminergiques au niveau des cellules de Kenyon. L'activation des récepteurs de la dopamine entraîne également une production d'AMPc (Figure 13) via l'activation d'une protéine G trimérique se couplant à l'adénylate cyclase. L'activation simultanée de la voie CS et de la voie US lors du conditionnement provoque une augmentation synergique de la production d'AMPc

(Figure 13) permettant aux cellules de Kenyon d'associer les deux événements (Busto *et al.*, 2010).



**Figure 13 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la détection de la coïncidence temporelle entre stimulus conditionné et non-conditionné lors de l'apprentissage**

Le stimulus conditionné (CS) est l'odeur utilisée lors du conditionnement et le stimulus non conditionné (US) peut être un choc électrique (conditionnement aversif) ou une récompense sucrée (conditionnement appétitif) (ACh : acétylcholine ; VDCC : canaux calciques voltage-dépendants ; CaM : Calmoduline ; AC : Adénylate Cyclase ; DA : Dopamine ; Dar : récepteur à la Dopamine ; cAMP : Adénosine MonoPhosphate cyclique) (modifié d'après Busto *et al.*, 2010).

Deux types de neurones efférents aux corps pédonculés ont également été décrits et semblent être impliqués dans la restitution de la mémoire (Figure 11C ; Guven-Ozkan et Davis, 2014) :

- les neurones MB-V2, dont les dendrites innervent une petite région des lobes verticaux ( $\alpha$  et  $\alpha'$ ) des corps pédonculés et connectent notamment cette région avec les cornes latérales (LH). Ces neurones semblent être impliqués dans la mémoire aversive à court et long terme (Séjourné *et al.*, 2011);
- les neurones MB-V3, dont les dendrites innervent la pointe des lobes  $\alpha$  des corps pédonculés. Ces neurones semblent quant à eux être impliqués dans la mémoire appétitive à long terme (Plaçais *et al.*, 2013).

Plusieurs protocoles expérimentaux impliquant l'utilisation de dispositifs en T (*cf.* Partie 6-b du matériel et méthodes) permettent d'étudier l'apprentissage et la mémoire olfactive aversive (association d'une odeur avec une série de chocs électriques) et appétitive (association d'une odeur avec une récompense sucrée) chez la drosophile (Malik et Hodge, 2014; Quinn *et al.*, 1974; Tempel *et al.*, 1983). Ces tests peuvent être utiles pour mettre en

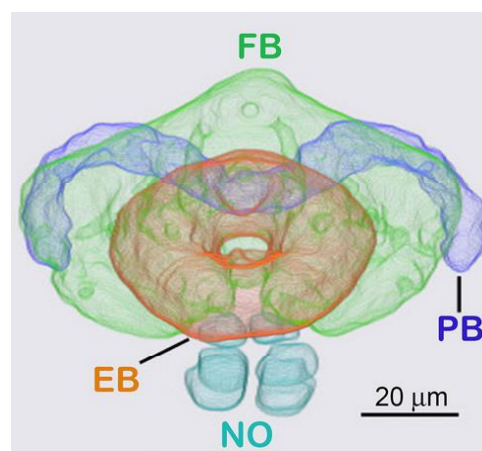
évidence le rôle d'une protéine dans la mémorisation.

Les corps pédonculés sont également connus pour être impliqués dans différents aspects du comportement locomoteur des drosophiles (activité locomotrice, réflexe de géotaxie négative) (Martin *et al.*, 1998; Riemensperger *et al.*, 2013; Serway *et al.*, 2009). Ces comportements présentent l'avantage d'être faciles à quantifier en laboratoire.

### c) Le comportement locomoteur

L'activité locomotrice (vitesse de déplacement des drosophiles) et le réflexe de géotaxie négative (comportement inné des drosophiles qui, lorsqu'elles sont placées au fond d'un tube par une série de secousses, se dirigent vers le haut de ce tube) représentent deux modalités du comportement locomoteur des drosophiles. L'étude du comportement locomoteur permet d'obtenir facilement des indications quant au rôle d'une protéine dans le fonctionnement du système nerveux en lien avec la locomotion. Toutefois, les mécanismes nerveux permettant aux corps pédonculés d'intervenir dans la locomotion sont beaucoup moins bien décrits que ceux leur permettant d'intervenir dans la mémorisation. Alors que le rôle des différents lobes des corps pédonculés dans l'activité locomotrice n'a pas été clairement défini (Martin *et al.*, 1998; Serway *et al.*, 2009), ce sont les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés qui semblent être impliqués dans le réflexe de géotaxie négative (Riemensperger *et al.*, 2013).

Par ailleurs, le complexe central joue aussi un rôle dans le comportement locomoteur (Strauss et Heisenberg, 1993; Strauss, 2002) (Figure 7). Cette structure nerveuse est composée de quatre régions : le corps ellipsoïde, le corps en éventail, le pont protocérébral et les nodules appariés (Figure 14; Wolff *et al.*, 2014).



**Figure 14 : Organisation anatomique du complexe central chez la drosophile**

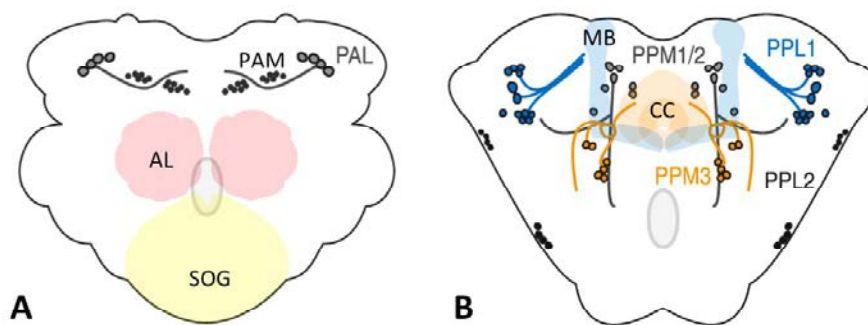
Le complexe central est composé de quatre parties : le corps ellipsoïde (EB) ; le corps en éventail (FB) ; le pont protocérébral (PB) et les nodules appariés (NO) (modifié d'après Wolff *et al.*, 2014).



Le complexe central semble être également impliqué dans d'autres fonctions nerveuses telles que la parade sexuelle (Sakai et Kitamoto, 2006) ou la mémoire visuelle (Pan *et al.*, 2009).

De par sa position centrale, cette structure nerveuse reçoit des afférences d'un grand nombre de neurones. Parmi ces neurones se trouvent les neurones dopaminergiques du groupe PPM3 (Figure 15). Ce groupe est sous-divisé en deux parties : les neurones PPM3a qui innervent le corps ellipsoïde et les neurones PPM3b qui innervent le corps en éventail et les nodules appariés (White *et al.*, 2010).

Les neurones dopaminergiques sont divisés en huit groupes principaux qui innervent différentes aires du cerveau (PPM1, PPM2, PPM3, PPL1, PPL2ab, PPL2c, PAL et PAM ; Figure 15). Comme le complexe central, les neurones dopaminergiques sont également connus pour leur rôle dans le comportement locomoteur (Barone et Bohmann, 2013; Riemensperger *et al.*, 2013).



**Figure 15 : Représentation schématique des principaux groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile**

A) Neurones dopaminergiques des groupes PAM et PAL, dont les corps cellulaires se situent dans la partie antérieure du cerveau ; B) Neurones dopaminergiques des groupes PPM1/2, PPL1, PPL2 et PPM3, dont les corps cellulaires se situent dans la partie postérieure du cerveau (SOG : ganglion sous-œsophagien ; AL : lobes antennaires ; MB : corps pédonculés ; CC : complexe central) (modifié d'après White *et al.*, 2010).

Comme pour les comportements précédemment décrits (perception et mémoire olfactives), plusieurs paradigmes comportementaux ont été mis en place pour étudier et quantifier l'activité locomotrice (*cf.* Partie 6-c du matériel et méthodes) et le réflexe de géotaxie négative des drosophiles (*cf.* Partie 6-d du matériel et méthodes) (Barone et Bohmann, 2013; White *et al.*, 2010). Comme les autres tests mentionnés auparavant, ces tests comportementaux peuvent également être utilisés pour mettre en évidence le rôle d'une protéine dans le fonctionnement du système nerveux.

#### Partie 4 : Objectifs de la thèse

Comme spécifié précédemment, les transporteurs d'acides aminés ont de multiples rôles dans l'organisme et sont impliqués dans de nombreuses maladies, notamment neurologiques. Ces protéines sont donc potentiellement des cibles thérapeutiques intéressantes dans la recherche de traitements contre différentes pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives ou encore l'épilepsie (Fotiadis *et al.*, 2013). Les études visant à caractériser précisément le rôle de ces transporteurs dans le système nerveux sont donc fondamentales pour comprendre leur fonctionnement physiologique et pathologique, identifier de nouveaux traitements mais également prévenir les effets secondaires potentiels de tels traitements.

Au sein de notre laboratoire, notre intérêt s'est porté sur le rôle des transporteurs HAT dans le fonctionnement du système nerveux chez *Drosophila melanogaster*. Les protéines HAT, qui sont principalement des échangeurs d'acides aminés, transportent une large gamme de substrats. Sur les cinq systèmes de transport que comptent les protéines HAT, seul le système  $b^{0,+}$  ne semble pas être représenté dans le cerveau (Fotiadis *et al.*, 2013). Les travaux réalisés dans l'équipe ont permis de mettre en évidence l'implication de trois protéines HAT de drosophiles dans le système nerveux: la chaîne légère Gb (système  $x_c^-$ ) et la chaîne lourde CD98hc dans la réponse olfactive (Grosjean *et al.*, 2008; Sourdot, 2014 Rapport de stage de Master 2 Recherche); et les chaînes légères Gb et JhI-21 sur la physiologie glutamatergique au niveau de la jonction neuromusculaire (Augustin *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, en révision).

Dans le cadre de ma thèse, mon objectif principal était d'étudier le rôle de Minidiscs (Mnd), qui appartiendrait aux transporteurs du système L (Reynolds *et al.*, 2009), dans le fonctionnement du système nerveux central. Mnd n'avait jusqu'à présent été décrit que pour son rôle de transporteur d'acides aminés dans le tissu adipeux permettant indirectement la prolifération cellulaire des disques imaginaux (Martin *et al.*, 2000). Chez les mammifères, les transporteurs du système L sont principalement décrits pour leur rôle dans la prolifération cellulaire (Kanai et Endou, 2001; Kurayama *et al.*, 2011; Yanagida *et al.*, 2001). Bien que le rôle putatif de LAT1 dans le fonctionnement du système dopaminergique soit suspecté (Kageyama *et al.*, 2000; Ohtsuki *et al.*, 2010), aucune étude n'a à ce jour démontré l'implication de transporteur du système L dans le fonctionnement du système nerveux.

Les expériences menées dans le cadre de ma thèse afin d'étudier le rôle de Mnd dans le fonctionnement du système nerveux se répartissent en quatre axes de recherche principaux.

Dans un premier temps, nous avons cherché à définir dans quelles structures du cerveau de drosophile Mnd est localisé. Les fonctions associées aux différentes structures cérébrales étant bien décrites chez la drosophile, la caractérisation du profil d'expression de *mind* était donc la première étape permettant d'obtenir des indications sur la fonction de Mnd dans le système nerveux central.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer quelle incidence Mnd peut avoir sur le fonctionnement nerveux en observant l'effet de sa dérégulation sur différents comportements. Les comportements étudiés ont été choisis en fonction des rôles connus des structures cérébrales dans lesquelles la présence de Mnd a pu être détectée. Le type de comportement modifié peut alors donner des indications supplémentaires concernant le rôle de Mnd dans le système nerveux central.

Dans un troisième temps, la configuration de Mnd et l'existence de partenaires protéiques potentiels ont été étudiées afin de mieux comprendre le fonctionnement de Mnd en tant que transporteur dans le système nerveux. Le but de ces expériences est de déterminer si, comme chez les mammifères, Mnd pouvait être associé à une chaîne lourde.

Enfin, dans un quatrième temps, nous avons cherché à définir la spécificité de transport de Mnd afin d'avoir des indications sur les mécanismes cellulaires qu'il influence. En effet, l'identification des différents substrats de Mnd peut apporter des renseignements importants sur le rôle de ce transporteur dans le fonctionnement du système nerveux. Mnd pourrait ainsi transporter des acides aminés ayant un rôle de neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'aspartate ou la glycine, comme c'est le cas de la protéine xCT de mammifère pour le glutamate (Sato *et al.*, 1999). Mnd pourrait également transporter des acides aminés précurseurs dans la synthèse de certains neurotransmetteurs tels que la tyrosine (précurseur de la dopamine et de l'octopamine), le tryptophane (précurseur de la sérotonine), le glutamate (précurseur du GABA) ou encore l'histidine (précurseur de l'histamine). C'est par exemple le cas de la protéine LAT1 pour la tyrosine et la L-DOPA, impliquées dans la synthèse de la dopamine (Kageyama *et al.*, 2000). Mnd pourrait aussi être à l'origine du transport de co-agonistes pour l'activation de certains récepteurs de neurotransmetteur, comme le transporteur Asc-1 dont le transport de la D-sérine et de la glycine permet l'activation des récepteurs NMDA avec le glutamate (Rosenberg *et al.*, 2013).

Pour résumer, les objectifs de mon travail de thèse étaient donc de définir la localisation de Mnd dans le cerveau ; de déterminer dans quels aspects du fonctionnement nerveux Mnd intervient ; d'étudier la conformation de Mnd et l'existence de partenaires protéiques potentiels et enfin d'identifier les acides aminés transportés par Mnd.

Ces recherches à visée fondamentale permettront d'améliorer nos connaissances globales sur le rôle de ce type de transporteur et de mieux comprendre leur importance dans le fonctionnement du système nerveux.



# MATÉRIEL ET MÉTHODES



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Partie 1 : Souches de drosophiles utilisées et création de nouvelles lignées

#### a) Élevage des drosophiles

Les drosophiles sont élevées à 25°C dans des tubes contenant un milieu nutritif (1,5% d'agar-agar, 10% de levure de bière, 9% de farine de maïs et 0,4% de para-hydroxybenzoate de méthyle (antifongique et antibactérien)) avec un cycle de 12h de jour/12h de nuit. Le maintien des souches se fait par repiquage des adultes dans des tubes de milieu frais à chaque génération (environ 10 jours à 25°C ; Figure 3).

#### b) Lignée choisie comme référence

La lignée *w<sup>1118</sup>* (Richard Benton ; isogénéisée en 2007) est une souche possédant un fond génétique de type sauvage, excepté pour le gène *white* rendant les yeux des drosophiles blancs. L'homogénéisation du fond génétique des différentes lignées utilisées pour la réalisation de tests comportementaux (à l'exception des lignées *c305a-Gal4* et *TH-Gal4* par manque de temps ; cf. Partie 2-e des résultats) est obtenue en rétrocroisant ces lignées sur cinq générations avec la lignée *w<sup>1118</sup>* isogénéisée. Les transgènes portés par nos différentes lignées comportent des séquences « *mini-white* » qui entraînent une coloration rouge plus ou moins intense des yeux, permettant de les suivre facilement. L'homogénéisation du fond génétique permet de s'affranchir au maximum de potentiels effets non spécifiques liés à l'intégration du transgène dans le génome et pouvant modifier le phénotype observé.

La lignée *Canton S* (*Cs* ; Yaël Grosjean), possédant également un fond génétique de type sauvage, a aussi été utilisée comme témoin dans le cadre de certains tests comportementaux.

#### c) Le système Gal4-UAS

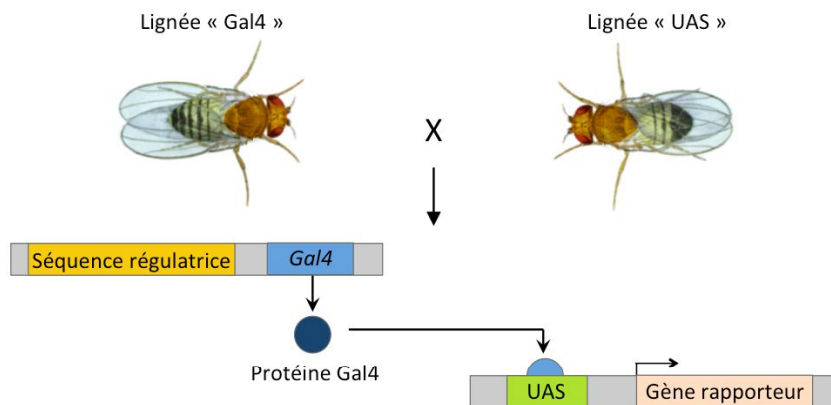
Le système Gal4-UAS fait intervenir deux transgènes complémentaires portant des séquences issues du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 16) :

- le gène *Gal4* (codant un facteur de transcription) dont l'expression est sous la dépendance d'une séquence régulatrice spécifique,
- le promoteur UAS (Upstream Activating Sequence) qui nécessite la fixation du facteur de transcription Gal4 pour activer le gène rapporteur sous sa dépendance.

Chacune de ces deux séquences doit être intégrée dans le génome de drosophile. Leur association par croisement de deux lignées possédant chacune l'un de ces transgènes



aboutira à un système fonctionnel. La descendance de ce croisement exprimera alors le gène rapporteur uniquement dans les tissus ou cellules où le facteur de transcription Gal4 est exprimé (Brand et Perrimon, 1993).



**Figure 16: Représentation schématique du fonctionnement du système Gal4-UAS**

Le transgène composé d'une séquence régulatrice et du gène codant pour le facteur de transcription Gal4 est intégré au génome des individus de la lignée « Gal4 ». Le transgène composé d'une séquence activatrice UAS et d'un gène rapporteur est intégré au génome des individus de la lignée « UAS ». Le gène rapporteur peut-être par exemple un marqueur fluorescent (GFP) ou un ARN interférent (ARNi). Les individus issus du croisement entre ces deux lignées seront porteurs des deux transgènes et exprimeront le gène rapporteur dans les cellules où le facteur de transcription Gal4 est produit sous la dépendance de la séquence régulatrice placée en amont.

#### d) Lignées Gal4 issues de Bloomington

Différentes lignées Gal4, sélectionnées pour la spécificité de leur profil d'expression, ont été commandées auprès du Bloomington Stock Center (Tableau XVIII).

**Tableau XVIII : Liste des lignées Gal4 commandées au Bloomington Stock Center**

[http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/gal4/gal4\\_all.php](http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/gal4/gal4_all.php)

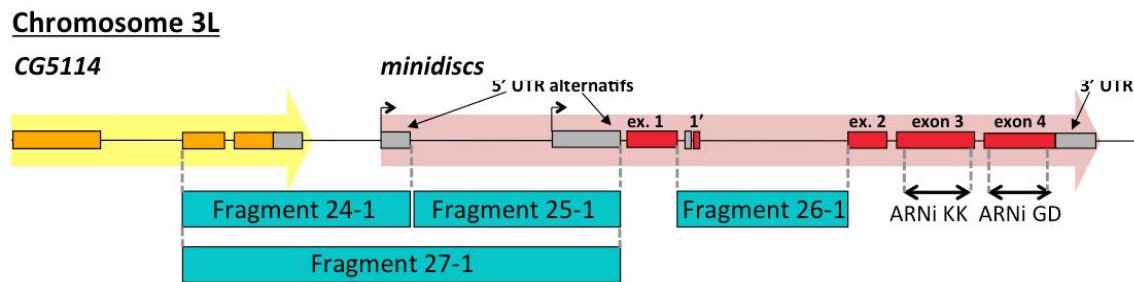
Lignée	Génotype	N° de stock	Expression
OK107-Gal4	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}ey[OK107]/In(4)ci[D], ci[D] pan[ciD] sv[spa-pol]	<a href="#">854</a>	Lobes $\alpha/\beta$ , $\alpha'/\beta'$ et $\gamma$ des corps pédonculés (MB)
c305a-Gal4	w[*]; P{w[+mW.hs]=GawB}Cka[c305a]	<a href="#">30829</a>	Lobes $\alpha'/\beta'$ des MB, corps ellipsoïde, lobes antennaires
c739-Gal4	$\gamma$ [1] w[67c23]; P{w[+mW.hs]=GawB}Hr39[c739]	<a href="#">7362</a>	Lobes $\alpha/\beta$ des MB, ganglion ventral
H24-Gal4	P{w[+mW.hs]=GawB}H24	<a href="#">51632</a>	Lobes $\gamma$ des MB, lobes antennaires
TH-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=ple-Gal4.F}3	<a href="#">8848</a>	Neurones dopaminergiques
Ddc-Gal4	w[1118]; P{w[+mC]=Ddc-Gal4.L}Lmpt[4.36]	<a href="#">7009</a>	Neurones dopaminergiques et sérotoninergiques
Actine-Gal4	$\gamma$ [1] w[*]; P{w[+mC]=Act5C-Gal4}25FO1/CyO, $\gamma$ [+]	<a href="#">4414</a>	Ubiquitaire

#### e) Création de lignées Gal4 à partir de séquences régulatrices de *minidiscs*

##### e.1) Amplification de différents fragments de *minidiscs* par PCR

Quatre lignées Gal4 ont été générées afin d'étudier le profil d'expression des différentes séquences potentiellement régulatrices de l'expression de *minidiscs* (*mnd*).

Ces séquences couvrent la région en amont du 1<sup>er</sup> exon (région promotrice) ainsi que le 1<sup>er</sup> intron de *mnd* où des éléments putatifs de régulation de la transcription (séquences *cis*-régulatrices) ont pu être identifiés par bioinformatique par Anna Ziegler (post-doctorante de l'équipe 14 du CSGA) (Figure 17). En effet, leur localisation sur un gène donné peut être prédite en utilisant des bases de données portant sur la conservation entre espèces de séquences *cis*-régulatrices (*cis*-Decoder ; Brody *et al.*, 2012).



**Figure 17 : Représentation schématique du locus *minidiscs* sur le chromosome 3L**

Les quatre séquences potentiellement régulatrices de l'expression de *mnd*, 24-1 (1346 paires de bases (pb)), 25-1 (2581 pb), 26-1 (1803 pb) et 27-1 (3768 pb) ; ainsi que les séquences cibles des ARN interférants (ARNi) GD (293 pb) et KK (335 pb) sont représentées par les zones encadrées par des pointillés.

Les quatre fragments correspondant à ces séquences ont été amplifiés par PCR. Les couples d'amorces utilisés pour permettre une amplification spécifique de ces fragments ont été définis en utilisant les séquences nucléotidiques du génome de drosophile fournies par Flybase (<http://flybase.org>). Le choix des amorces et le calcul des températures de fusion théorique ont été réalisés à l'aide de Primer3Plus (<http://primer3plus.com>) et le contrôle de la qualité des amorces à l'aide d'OligoCalc (<http://simgene.com/OligoCalc>). Un site de restriction pour KpnI (GGTACC) a été ajouté à la séquence des amorces permettant d'amplifier ces fragments (Tableau XIX). Ce site servira par la suite au clonage de ces fragments.

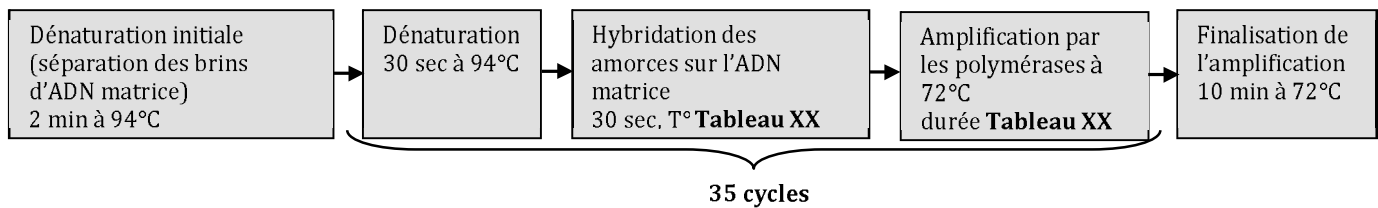
**Tableau XIX : Caractéristiques des différentes amorces utilisées pour l'amplification des séquences régulatrices de *mnd* (site KpnI souligné)**

Nom amorce	Séquence (5'-3')	Température de fusion théorique (T <sub>m</sub> )
24-1-for	<u>GGTACC</u> GGTGAGTGCTCCAGTGGTAAA	57,7°C
24-1-rev	<u>GGTACCT</u> ACCATTTCGCACTGATAACC	56,2°C
25-1-for	<u>GGTACC</u> GGGTAACGGTTCTCCCTCTATC	59,2°C
25-1-rev	<u>GGTACCT</u> CCACGTGGTTCTATCATGTTTC	57,8°C
26-1-for	<u>GGTACCC</u> GTTCGGGGTAAAGCTAAAGAA	56,3°C
26-1-rec	<u>GGTACC</u> ATCGTGCCTGGAAAAGTTAAAA	53,4°C

Les éléments suivants ont été utilisés pour la réaction de PCR selon le protocole du kit « High Fidelity PCR Enzyme Mix » de Fermentas :

- l'ADN génomique (ADNg) de drosophile servant de matrice pour l'amplification (cf. Partie 3-a.1 du matériel et méthodes pour le protocole d'extraction d'ADNg),
- le mélange d'enzymes « High Fidelity PCR Enzyme Mix » de Fermentas qui contient la Taq DNA Polymérase ainsi qu'une autre DNA Polymérase thermostable possédant une activité correctrice (permet la synthèse du brin complémentaire de l'ADN matrice avec une fidélité quatre fois plus importante qu'avec la Taq DNA polymérase seule),
- le tampon supplémenté en MgCl<sub>2</sub>,
- les amorces sens et antisens,
- un mélange des 4 dNTPs.

Les cycles réalisés pour l'amplification sont détaillés dans la Figure 18.



**Figure 18 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les différents fragments de *minidiscs***

La température d'hybridation et la durée d'amplification ont été adaptées pour chacune des réactions PCR en tenant compte des caractéristiques des amorces sens et anti-sens et de la longueur du fragment à amplifier (Tableau XX).

**Tableau XX : Conditions utilisées pour la PCR**

Fragment	24-1	25-1	26-1	27-1
<b>Amorces</b>	24-1-for 24-1-rev	25-1-for 25-1-rev	26-1-for 26-1-rev	24-1-for 25-1-rev
<b>Taille du fragment</b>	1346 pb	2581 pb	1803 pb	3768 pb
<b>T° d'hybridation utilisée</b>	52°C	54°C	52°C	57,5°C
<b>Durée d'élongation</b>	1,5 min	4 min	2 min	4 min

L'amplification correcte des fragments a été vérifiée par électrophorèse. Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés des autres composants du mélange de PCR par excision des bandes d'intérêt sur gel et en utilisant le kit « NucleoSpin®Extract II » de Macherey-Nagel en suivant le protocole fourni.

### e.2) Clonage et transformation bactérienne

Les fragments amplifiés par PCR ont ensuite été clonés dans pGEM®-T Easy (Promega) selon les instructions du fournisseur (Figure 19).

Des bactéries (*E. coli*, DH5α) rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium (qui fragilise la membrane et la rend perméable aux ADN plasmidiques) ont été transformées avec le vecteur pGEM®-T Easy contenant la séquence 24-1, 25-1, 26-1 ou 27-1 puis sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline.

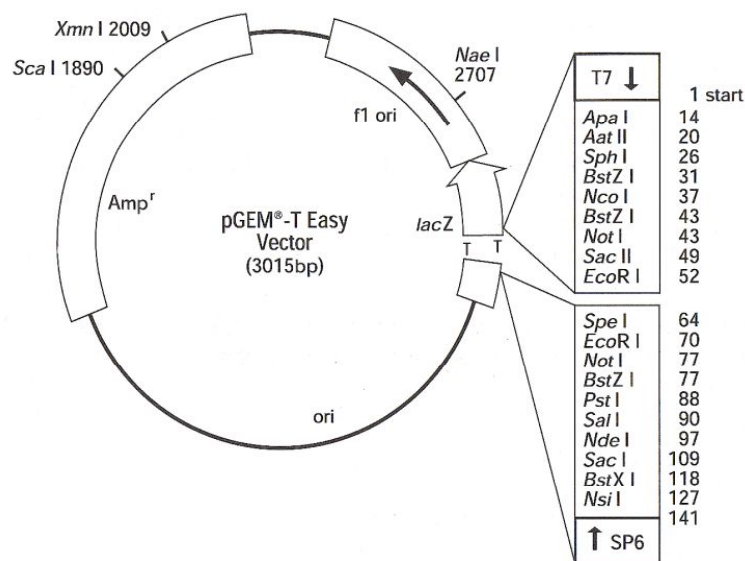


Figure 19 : Structure du vecteur pGEM®-T Easy

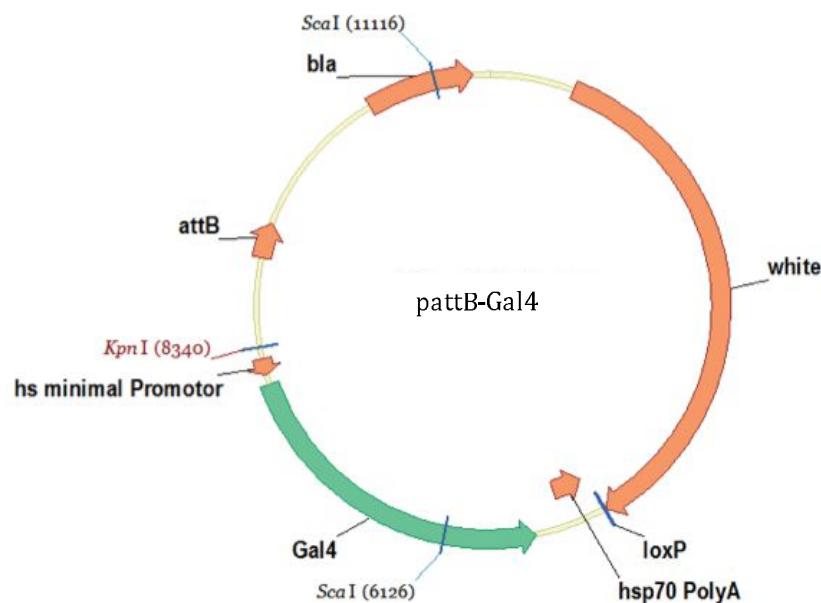
### e.3) Extraction d'ADN plasmidique et sous-clonage

L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries transformées par lyse alcaline. Lors de ces extractions, le milieu de culture est éliminé par centrifugation (2 min à 1500g). Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans 300 µL de solution de resuspension (50 mM glucose, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8). Les bactéries sont lysées dans 300 µL d'une solution de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS (détergent), pH 13) puis cette solution est neutralisée dans 300 µL de solution de neutralisation (3 M potassium/5 M acétate). Seuls les brins d'ADN plasmidique, courts (~10<sup>3</sup> paires de base), parviennent à se réappairier et restent en solution. Les débris cellulaires, les protéines, le détergent et l'ADN chromosomique sont quant à eux précipités par centrifugation (15 min à 9300g). L'ADN plasmidique est récupéré dans la phase liquide puis est concentré par précipitation à l'isopropanol (600 µL) et par centrifugation (30 min à 9300g). Le culot est lavé avec 50 µL d'éthanol 70%. L'ADN est ensuite resuspendu dans 20 µL de tampon Tris-EDTA. L'EDTA, qui est un chélateur

d'ions divalents, permet d'inhiber les nucléases dont l'activité nécessite la présence de  $Mg^{2+}$ .

Une fois purifiés, les plasmides pGEM®-T Easy contenant la séquence 24-1, 25-1, 26-1 ou 27-1 ont été digérés par KpnI (selon les instructions du fournisseur, Fermentas). Les inserts ont été séparés du plasmide par électrophorèse (gel d'agarose à 10%). Les fragments ont ensuite été excisés du gel d'agarose et purifiés en utilisant le kit « NucleoSpin®Extract II » de Macherey-Nagel selon les instructions du fournisseur.

Les fragments ont ensuite été clonés dans le vecteur de transgénèse pattB-Gal4-rev (Figure 20).



**Figure 20 : Structure du vecteur pattB-Gal4**

Les plasmides ont été linéarisés après digestion enzymatique par KpnI (selon le protocole fourni par Fermentas), puis traités à la phosphatase afin d'empêcher les vecteurs sans insert de se recirculariser en générant une extrémité 5'OH (la « Calf Intestinal Alkaline Phosphatase » d'Invitrogen est utilisée selon les instructions du fournisseur). En effet, lors de l'étape de ligation, la T4 DNA ligase ne peut recréer une liaison phosphodiester qu'entre une extrémité 5'Phosphate et une extrémité 3'OH. Par contre, les fragments n'ayant pas été déphosphorylés et ayant aussi été digérés par KpnI pourront être ligués dans ce vecteur par cette enzyme.

Des bactéries ont ensuite été transformées et sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline. Différents tests de restriction ont ensuite été réalisés (les produits de digestion étant ensuite séparés par électrophorèse) pour vérifier la présence et le sens de l'insert dans les plasmides. Les colonies ayant bien intégré le plasmide contenant l'insert

dans la bonne orientation ont été sélectionnées d'après les résultats des tests de restriction. Ces colonies ont alors été remises en culture. L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries transformées en utilisant le kit « QIAGEN Plasmid Purification » (MIDI kit, selon le protocole fourni) afin d'obtenir la pureté requise pour leur injection dans des embryons de drosophiles.

#### *e.4) Intégration au génome de drosophile*

Après séquençage (Eurofins mwg operon), ces constructions plasmidiques ont été intégrées de façon dirigée au génome de drosophiles (Genetic Services INC.). Les lignées de drosophiles utilisées pour chacune de ces transformations sont des lignées conçues par la communauté scientifique et qui possèdent des séquences cibles attP dans des régions intergénomiques prédéterminées de leur génome. Les vecteurs pattB-Gal4 s'intègrent préférentiellement au niveau de ces séquences cibles grâce à la recombinaison entre les séquences attB du plasmide et attP du génome de drosophile. Cette recombinaison est catalysée par l'intégrase site-spécifique codée initialement par le bactériophage  $\phi$ C31 et permettant la recombinaison dirigée entre un site d'attachement bactérien (attB) et un site d'attachement du bactériophage (attP) (Bischof *et al.*, 2007).

Le site d'intégration attP2 (3<sup>ème</sup> chromosome) a été choisi pour les fragments 24-1, 26-1 et 27-1 tandis que le site attP40 (2<sup>ème</sup> chromosome) a été utilisé pour le fragment 25-1. Deux sites d'intégration différents ont été choisis pour les fragments 24-1 et 25-1 afin d'avoir la possibilité d'associer ces deux outils génétiques.

Un gène codant pour la protéine White est présent sur le vecteur pattB-Gal4. Cette protéine permet de restaurer la coloration rouge des yeux des drosophiles *w<sup>1118</sup>* si celles-ci ont intégré le vecteur pattB-Gal4 dans leur génome.

#### **f) Lignées UAS provenant de Bloomington et du VDRC**

Deux lignées UAS-GFP ont été utilisées afin de visualiser le profil d'expression des différentes lignées Gal4 (Tableau XXI). Lorsque ces lignées sont croisées avec une lignée Gal4, les drosophiles issues de ce croisement expriment la GFP dans différents types cellulaires selon les capacités régulatrices du fragment de promoteur placé en amont du gène Gal4. La fusion de la GFP avec la protéine membranaire de souris mCD8 permet à la GFP d'être enrichie à la membrane plasmique des cellules. De la même manière, l'utilisation d'un signal de localisation nucléaire (nls) favorise la concentration de la GFP dans le noyau des cellules.

## Tableau XXI : Liste des lignées UAS utilisées

[http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/uas/uas\\_nonRNAi.php](http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/uas/uas_nonRNAi.php) ; <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>

Lignée	Génotype	Provenance	N° de stock
UAS-mCD8GFP	w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=15XUAS-IVS-mCD8::GFP}attP2	Bloomington	<a href="#">32193</a>
UAS-nlsGFP	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-GFP.nls}8	Bloomington	<a href="#">4776</a>
UAS- <i>mnd</i> <sup>dsRNA</sup> KK	w;P{KK102686}VIE-260B	VDRC	<a href="#">110217</a>
UAS- <i>mnd</i> <sup>dsRNA</sup> GD	w;P{GD453}v42485	VDRC	<a href="#">42485</a>

De la même façon, les deux lignées UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup> utilisées (Tableau XXI), lorsqu'elles sont croisées avec une lignée Gal4, entraînent l'expression d'ARN interférents (ARNi). L'expression de *mnd* est alors spécifiquement altérée dans les cellules exprimant le facteur de transcription Gal4. Ces deux lignées diffèrent par la séquence de *mnd* que cible chaque ARNi et par la façon dont les constructions UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup> ont été intégrées au génome de drosophile.

La lignée UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD a été produite par intégration aléatoire du transgène dans le génome via l'utilisation d'un élément transposable de type P. L'ARNi « GD » est complémentaire de la séquence de l'exon 4 de *mnd* (Figure 17). L'intégration aléatoire d'un transgène dans le génome a l'inconvénient de pouvoir entraîner des résultats faux-positifs (si le lieu d'insertion n'est pas neutre et perturbe un ou plusieurs gène(s) au voisinage) mais également des faux-négatifs (si l'insertion a lieu dans une région génomique où la transcription est inhibée).

La lignée UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK a été produite par intégration dirigée du transgène via l'intégrase site-spécifique  $\phi$ C31 dans le site d'insertion VIE-260b présent sur le bras gauche du chromosome 2. L'ARNi « KK » est complémentaire de la séquence de l'exon 3 de *mnd* (Figure 17). L'intégration dirigée d'un transgène dans le génome permet théoriquement d'éliminer les risques liés à une insertion aléatoire. Cependant, des problèmes d'insertions multiples de transgènes ont pu être constatés pour certaines lignées de la collection KK, entraînant à leur tour des résultats faux-positifs ou faux négatifs (Green *et al.*, 2014).

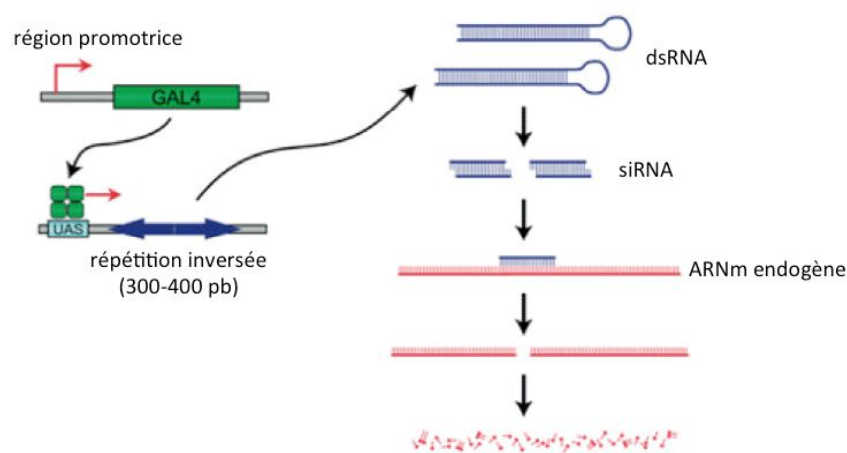
### g) Principe de l'interférence par ARN

Les drosophiles issues d'un croisement entre une lignée Gal4 et une lignée UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup> produiront des ARN doubles brins (dsRNA) dans les cellules exprimant le facteur de transcription Gal4 (Figure 21).

Les dsRNA sont pris en charge par une ribonucléase appelée DICER, qui va cliver ces dsRNA précurseurs en petits fragments nommés siRNA (small interfering RNA). Après clivage, les siRNA double brins fixés à DICER vont s'associer à la protéine Argonaute pour

former le complexe multi-protéique RISC (RNAi Induced Silencing Complex). Une fois le complexe RISC activé, les deux brins du siRNA sont dissociés et l'une des extrémités 5' de l'ARN reste fixée à la protéine Argonaute. Le siRNA simple brin va alors diriger le complexe RISC vers la séquence de l'ARN messenger (ARNm) cible.

La complémentarité de séquence entre le siRNA et une partie de l'ARNm de *mnd* permet leur hybridation. Si cette hybridation est parfaite, alors le complexe RISC clivera cet ARNm. L'ARNm est ainsi rapidement dégradé, empêchant sa traduction en protéine. Les drosophiles produisant des ARNi complémentaires de *mnd* seront donc en théorie hypomorphes pour ce gène, cette technique ne permettant à priori pas d'abolir complètement la production de la protéine correspondante comme cela serait le cas pour un mutant nul.



### Figure 21 : Mécanisme de l'interférence par ARN (ARNi)

Le système Gal4/UAS est utilisé pour entraîner l'expression d'ARN double brin (dsRNA) dans un type cellulaire. Ces dsRNA sont clivés par DICER en siRNA puis sont pris en charge par le complexe protéique RISC. Ce complexe provoque la dégradation séquence-spécifique de l'ARNm cible endogène (<http://stockcenter.vdrc.at/control/howtornaidmel>).

#### h) Création de la lignée UAS-minidiscs

##### *h.1) Amplification de l'ADNc de minidiscs par PCR, clonage et sous-clonage*

Afin de pouvoir diriger l'expression de *mnd* avec le système Gal4/UAS, une lignée UAS-*mnd* a été générée. Le plasmide contenant l'ADNc de *mnd* (LD25378) a été commandé auprès du Drosophila Genomics Resource Center (collection DGC gold BDGP). Cet ADNc a été amplifié par PCR avec des amorces permettant d'ajouter un site de restriction pour XhoI (CTCGAG) en amont du codon Start de *mnd* et un site pour XbaI (TCTAGA) en aval du codon Stop (Tableau XXII). Ces sites serviront par la suite au clonage de l'ADNc de *mnd* dans le vecteur final.



La même procédure et les mêmes réactifs que pour la création des lignées Gal4 à partir de séquences régulatrices de *mnd* ont été utilisés (cf. Partie 1-e du matériel et méthodes). La température d'hybridation et la durée d'amplification de la PCR ayant permis l'amplification de l'ADNc de *mnd* sont détaillées dans le Tableau XXII.

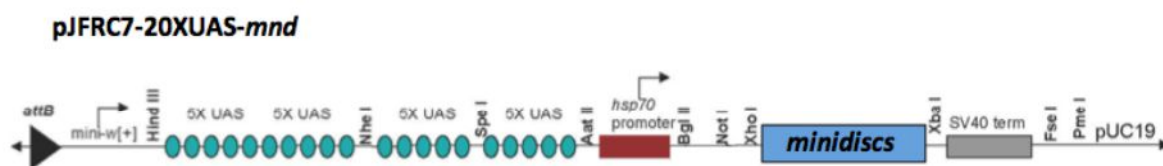
**Tableau XXII : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNc de *mnd* et conditions utilisées pour la PCR**

Les sites de restriction XhoI pour l'amorce for et XbaI pour l'amorce rev sont soulignés, le codon Start et le codon Stop sont en gras.

Nom amorce	ADNc- <i>mnd</i> -for	ADNc- <i>mnd</i> -rev
Séquence (5'-3')	<u>CTCGAGATGGCGCGAGTTCAGGC</u>	<u>TCTAGACTAGTCGA</u> ACTTCTCCTGGTTGG
T° de fusion théorique (Tm)	63,6°C	61,5°C
Taille du fragment	1512 pb	
T° d'hybridation utilisée	55°C	
Durée d'élongation	2 min	

Comme précédemment, ce fragment de PCR a d'abord été cloné dans pGEMT®-Easy. Puis, après transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique, les vecteurs pGEM®-T Easy contenant l'ADNc de *mnd* ont été digérés par XhoI et XbaI (selon les instructions du fournisseur, Fermentas) afin de récupérer l'insert.

L'ADNc de *mnd* a ensuite été cloné dans le vecteur de transgénèse pJFRC7-20XUAS-IVS-mCD8GFP (Pfeiffer *et al.*, 2010) à la place de la GFP, après digestion de ce vecteur par XhoI et XbaI dont les sites de restriction encadrent la GFP (Figure 22). Le vecteur pJFRC7-20XUAS-IVS a été optimisé par Pfeiffer et collaborateurs pour permettre une expression maximale du gène en aval des séquences UAS (Pfeiffer *et al.*, 2010).



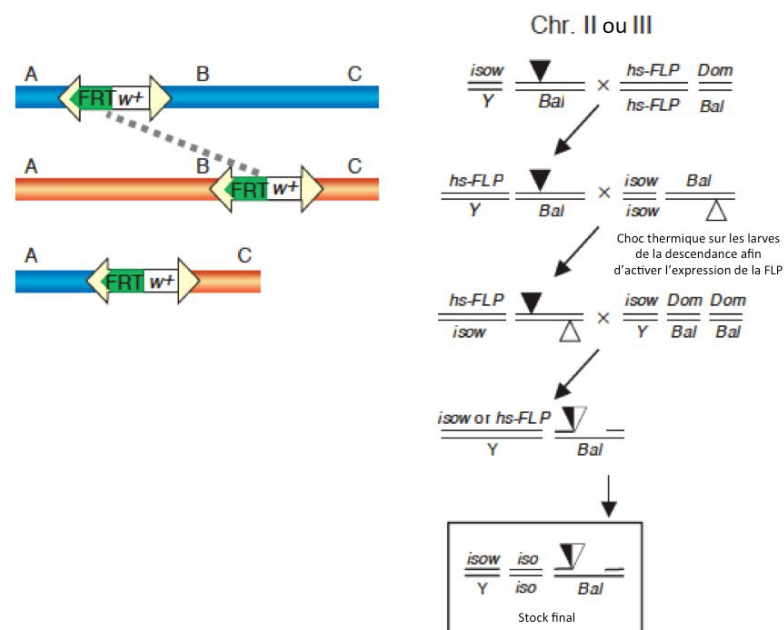
**Figure 22 : Représentation schématique du plasmide pJFRC7 ouvert contenant 20 séquences UAS dans lequel a été cloné l'ADNc de *mnd***

### *h.2) Intégration au génome de drosophile*

Après transformation bactérienne, purification de l'ADN plasmidique et séquençage, cette construction plasmidique a été intégrée de façon dirigée au génome de drosophile au niveau du site d'insertion attP16 (2<sup>ème</sup> chromosome) (Genetic services INC.). Un gène codant pour la protéine White est présent sur le vecteur pJFRC7 et permet donc de suivre facilement la présence de ce transgène dans le génome.

### i) Lignées et procédure utilisées pour la délétion de *minidiscs*

Afin d'obtenir un mutant nul pour *Mnd*, la procédure décrite par Parks et collaborateurs pour générer une délétion basée sur le système FLT/FRT a été suivie (Parks *et al.*, 2004). Cette procédure fait intervenir différents croisements entre une lignée de drosophile exprimant la recombinaise inductible par la chaleur *hsFLP* et deux lignées ayant intégré dans leur génome un transposon portant un site de recombinaison FRT (Figure 23). La réalisation d'un choc thermique (1 heure à 37°C) sur des larves ayant intégré chacun de ces trois éléments peut mener à la *trans*-recombinaison entre les deux sites FRT. Cet événement engendre alors la délétion de l'ADN génomique situé entre ces deux sites.



**Figure 23 : Principe de la recombinaison FLP/FRT et procédure à suivre afin d'obtenir une délétion de l'ADNg situé entre deux sites FRT**

La combinaison de deux transposons portant des sites FRT (triangles) en *trans* avec la recombinaise *hs-FLP* est réalisée grâce à une série de croisement. L'activation de la recombinaise par un choc thermique permet de générer une délétion entre les deux sites FRT qui peut être détectée par PCR. La délétion est établie après isogénéisation du stock final avec un balancer (Bal) (modifié d'après Parks *et al.*, 2004).

L'outil DrosDel (<http://www.drosdel.org.uk/>) permet d'identifier toutes les combinaisons de lignées dont les sites FRT sont compatibles entre eux pour obtenir la délétion d'un gène donné (Figure 24). Dans le cas de *mnd*, les lignées portant les transposons e01921 et f02785 ont été retenues car elles semblent permettre l'obtention de la délétion la plus large (2831 pb), sans pour autant affecter les gènes voisins. La recombinaison entre les sites FRT de ces deux lignées devrait ainsi conduire à la délétion du 1<sup>er</sup> exon de *mnd* et donc du codon Start de la traduction. La protéine *Mnd* ne devrait alors plus être produite à la suite de cette délétion.

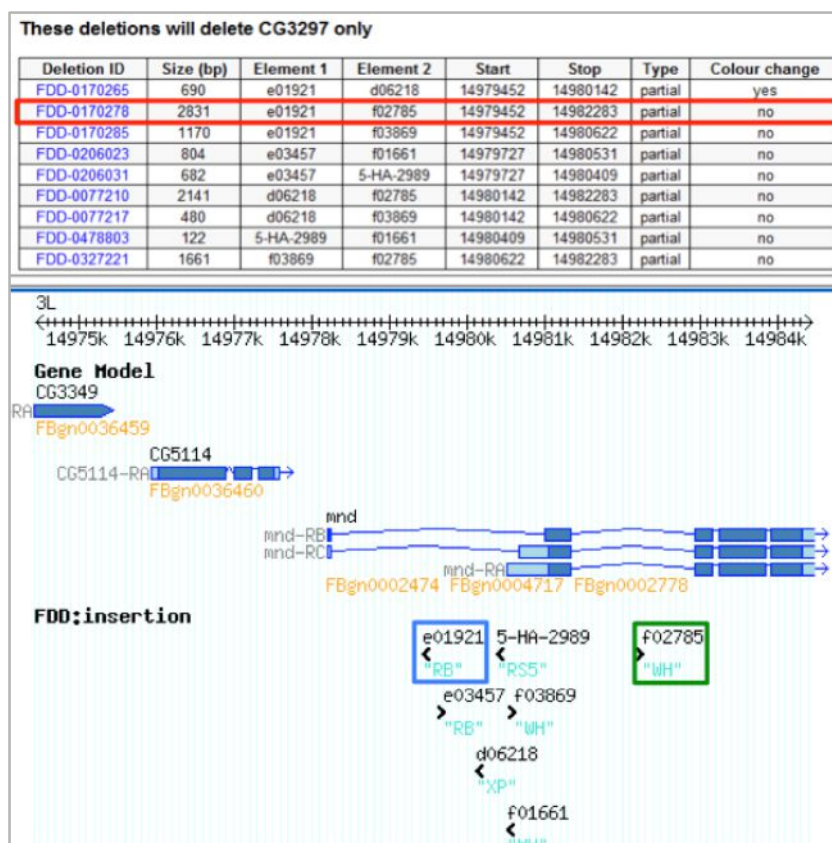


Figure 24 : Différentes combinaisons possibles de lignées porteuses d'un site FRT dont le croisement permettrait la délétion de *mnd* (DrosDel)

Les lignées portant les transposons e01921 et f02785 ont été sélectionnées pour la délétion de *mnd* car cette combinaison correspond à la délétion la plus large. Cette délétion du 1<sup>er</sup> exon de *mnd* permettrait de supprimer le codon Start de la traduction.

Les lignées commandées pour la réalisation de ces différents croisements sont indiquées dans le Tableau XXIII. Le balancier TM6b a permis de stabiliser les différentes lignées candidates obtenues au terme de ces croisements.

Tableau XXIII : Liste des lignées utilisées pour la délétion de *minidiscs*

<http://flystocks.bio.indiana.edu/Reports/26902.html> ; <https://drosophila.med.harvard.edu/>

Lignée	Génotype	Provenance	N° de stock
hsFLP	P{ry[+7.2]=hsFLP}1, y[1] w[1118]; Dr[1]/TM3, Sb[1]	Bloomington	<a href="#">26902</a>
<i>mnd</i> <sup>e01921</sup>	w; PBac{RB}mnd(e01921)	Exelixis	-
<i>mnd</i> <sup>f02785</sup>	w; PBac{WH}mnd(f02785)	Exelixis	-

## Partie 2 : Lignée cellulaire utilisée et création d'outils génétiques

### a) Conditions de culture des cellules S2 de drosophiles

Les cellules de Schneider (cellules S2) sont l'une des lignées cellulaires de drosophile les plus couramment utilisées. Ces cellules proviennent d'une culture primaire de cellules embryonnaires de drosophiles de stade tardif (âgées de 20-24 heures) (Schneider, 1972).

Les cellules S2 sont des cellules semi-adhérentes qui se détachent de leur support au-delà de 100% de confluence. Elles sont cultivées dans du milieu de Schneider contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) décomplémenté et des antibiotiques (Pénicilline à 50 unités/mL et Streptomycine à 50 µg/mL) dans une atmosphère à 28°C sans CO<sub>2</sub> et sous humidité saturante selon les instructions du fournisseur (*Invitrogen* Life Science Technologies). Le passage des cellules s'effectue lorsque leur concentration atteint 10 millions de cellules/mL. Les cellules sont alors décrochées du support par simple pipetage avant d'être comptées et réensemencées à la concentration choisie.

## b) Création d'ARN double brins et méthodes de transfection

### b.1) Synthèse d'ARN double brins

Afin de déréguler l'expression de *mnd* dans des cellules S2 en culture, des dsRNA complémentaires d'une partie de l'exon 3 de *mnd* ont été synthétisés *in vitro*.

La préparation de l'ADN servant de support à cette synthèse a été obtenue par PCR à partir du plasmide contenant l'ADNc de *mnd* (LD25378) en utilisant des amorces permettant d'ajouter le site de fixation de la T7RNA polymérase de chaque côté de cet ADN support (Tableau XXIV). La même procédure de PCR et les mêmes réactifs que pour l'amplification des séquences régulatrices de *mnd* ont été utilisés (*cf.* Partie 1-e.1 du matériel et méthodes). La température d'hybridation et la durée d'amplification de la PCR ayant permis l'amplification de l'ADN support pour la synthèse des dsRNA-*mnd* sont détaillées dans le Tableau XXIV.

#### Tableau XXIV : Caractéristiques des amorces utilisées pour la synthèse *in vitro* de dsRNA-*mnd* et conditions utilisées pour la PCR

Le site de fixation de la T7RNA polymérase est indiqué en bleu.

Nom amorce	dsRNA- <i>mnd</i> -for	dsRNA- <i>mnd</i> -rev
Séquence (5'-3')	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAACATCTTTACGGGCACCAAG	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACACTGCATCTGACGAAAGGA
T° de fusion théorique (T <sub>m</sub> )	60°C	60°C
Taille du fragment	335 pb	
T° d'hybridation utilisée	50°C	
Durée d'élongation	30 secondes	

L'amplification correcte des fragments a été vérifiée par électrophorèse. Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés des autres composants du mélange de PCR par excision des bandes d'intérêt sur gel et en utilisant le kit « NucleoSpin®Extract II » de Macherey-Nagel selon les instructions du fournisseur.

Après quantification des produits de PCR à 260 nm par spectrophotométrie (SPECTROstar<sup>Nano</sup> ; BMG Labtech), ceux-ci ont été utilisés pour la synthèse *in vitro* des dsRNA-*mind* en suivant le protocole fourni avec le kit « Ambion MEGAscript T7 » (Life Technologies). Cette synthèse fait intervenir les éléments suivants :

- l'ADN support encadré par le site de fixation de la T7RNA polymérase servant de matrice pour la transcription en ARN,
- le mélange d'enzymes « MEGAscript T7 » contenant la T7RNA polymérase,
- le tampon apportant les conditions nécessaires au fonctionnement de l'enzyme,
- un mélange des 4 ribonucléotides pour la transcription en ARN de l'ADN support,
- une solution d'Acétate d'Ammonium permettant de stopper la réaction après l'incubation de 4h à 37°C.

Après purification des ARN (extraction phénol/chloroforme réalisée selon les instructions du kit « Ambion MEGAscript T7 »), ceux-ci sont resuspendus en conditions stériles dans de l'eau RNase-free filtrée à 0,22 µm. Afin de permettre l'appariement des brins d'ARN complémentaires, ceux-ci sont placés 30 minutes à 65°C puis refroidis doucement à température ambiante avant d'être quantifiés à 260 nm.

### *b.2) Méthodes de transfection*

Deux méthodes ont été utilisées pour le traitement des cellules S2 avec ces dsRNA.

La première méthode est basée sur la capacité de nombreuses lignées cellulaires de drosophiles (dont les cellules S2) d'intégrer spontanément les dsRNA par endocytose (Saleh *et al.*, 2006; Ulvila *et al.*, 2006). Le protocole utilisé a été adapté d'après les travaux sur cellules S2 menés par Reynolds, Worby et leurs collaborateurs (Reynolds *et al.*, 2009; Worby *et al.*, 2001).

La seconde méthode consiste à transfecter les cellules avec les dsRNA en utilisant un vecteur lipidique formant spontanément des structures micellaires autour des dsRNA avant de fusionner avec la membrane des cellules. Le protocole utilisé a été adapté d'après les travaux sur cellules S2 menés par Zhou et collaborateurs (Zhou *et al.*, 2013).

Dans les deux cas, les cellules sontensemencées à 0,5 million de cellules/mL en plaques 6 puits (2 mL par puits) et sont incubées pendant 24 heures à 28°C avant de réaliser le 1<sup>er</sup> traitement avec les dsRNA.

Pour la première méthode, ce traitement consiste à ajouter 15 µg de dsRNA par puits directement dans le milieu de culture des cellules. Pour la seconde méthode, les dsRNA sont mélangés avec de l'Effectène® Transfection Reagent selon le protocole fourni par QIAGEN puis ce mélange est ajouté au milieu de culture des cellules afin d'avoir

l'équivalent de 2 µg de dsRNA par puits. Les cellules sont ensuite incubées 48 heures à 28°C avant de réaliser le 2<sup>ème</sup> traitement avec les dsRNA selon la même procédure. Après 72 heures d'incubation supplémentaire, les cellules sont décrochées par une série de pipetages puis centrifugées à 200g pendant 6 minutes. Le culot de cellules est alors repris dans un volume de milieu de culture sans SVF (augmente l'adhérence des cellules au support). Les cellules sont ensuite comptées et réensemencées à 0,5 million de cellules/mL en plaques 24 puits (1 mL par puits) avant d'être traitées une 3<sup>ème</sup> fois avec les dsRNA. Ces cellules pourront alors être utilisées pour différentes expériences après avoir été incubées 24 heures à 28°C.

### c) Création de vecteurs pour la sur-expression de protéines et méthode de transfection

#### c.1) Vecteur pour la sur-expression de minidiscs

Afin de pouvoir sur-exprimer Mnd dans les cellules S2, l'ADNc de *mnd* a été cloné dans le vecteur d'expression pMT/V5-His A (Invitrogen) portant le promoteur pMT inducible par le sulfate de cuivre (Figure 25).

Pour réaliser ce clonage, le vecteur pGEM®-T Easy contenant l'ADNc de *mnd* précédemment créé (cf. Partie 1-h.1 du matériel et méthodes) a été digéré par les enzymes de restriction XhoI et XbaI (selon les instructions du fournisseur, Fermentas) afin de récupérer l'insert. L'ADNc de *mnd* a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pMT/V5-His A après digestion de ce vecteur par XhoI et XbaI selon la méthode utilisée précédemment (cf. Partie 1-e.3 du matériel et méthodes).

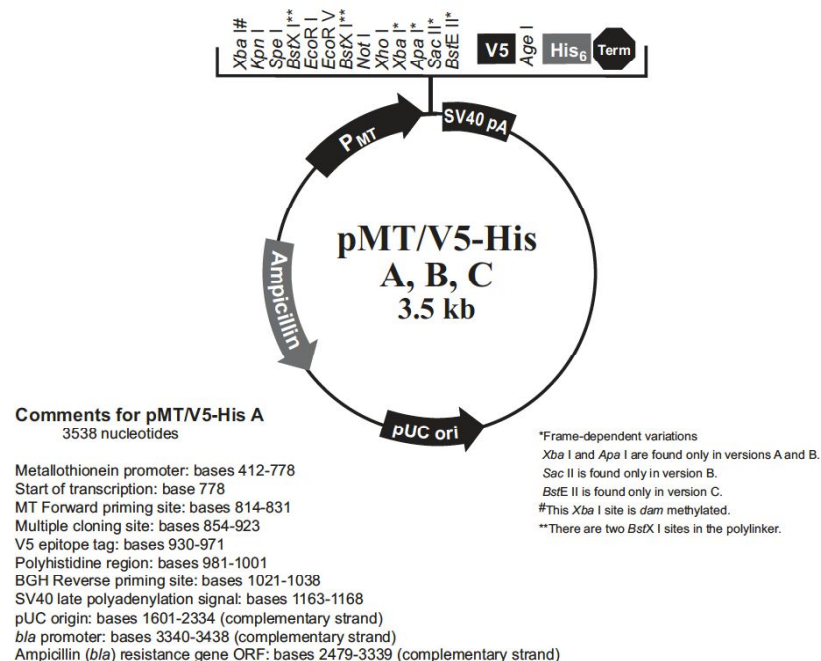


Figure 25 : Structure du vecteur pMT/V5-His A

Après transformation de bactéries « One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* » selon les instructions du fournisseur (Invitrogen) et extraction d'ADN plasmidique, différents tests de restriction ont été réalisés pour vérifier la présence et le sens de l'insert dans les plasmides. Les colonies ayant bien intégré le plasmide contenant l'insert dans la bonne orientation ont été remises en culture afin d'obtenir un grand nombre de copies de ces constructions plasmidiques. L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries en utilisant le kit « Promega Pure Yield Plasmid MIDI prep system » (selon le protocole fourni) afin d'obtenir une pureté de purification compatible avec la transfection en cellules S2.

### c.2) Vecteur pour la sur-expression de protéines taguées

Afin de pouvoir sur-exprimer Mnd tagué à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale (N-ter) ou CD98hc (chaîne lourde putative de Mnd) tagué à l'extrémité COOH-terminale (C-ter) dans les cellules S2, les ADNc de *mnd* et de *CD98hc* ont chacun été clonés dans le vecteur d'expression pMT-DEST48 (Invitrogen) portant le promoteur pMT inductible par le sulfate de cuivre (Figure 26). Ce vecteur est dérivé du vecteur pMT/V5 afin d'être adapté à la technologie de clonage Gateway® commercialisée par Invitrogen.

Le plasmide contenant l'ADNc de *mnd* (LD25378) obtenu auprès du Drosophila Genomics Resource Center a été utilisé lors de la réalisation de ces constructions.

Par contre, la séquence de l'ADNc de *CD98hc* (RE39378) disponible au Drosophila Genomics Resource Center ne correspondant pas à la séquence réelle de *CD98hc* (vérifiée par séquençage), cet ADNc a été commandé et synthétisé auprès d'Eurofins mwg operon (envoyé dans le plasmide pUC57).

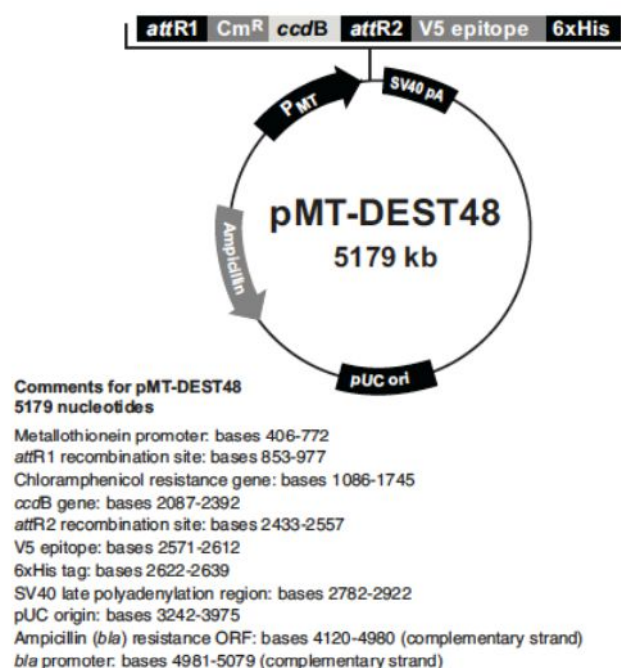


Figure 26 : Structure du vecteur pMT-DEST48

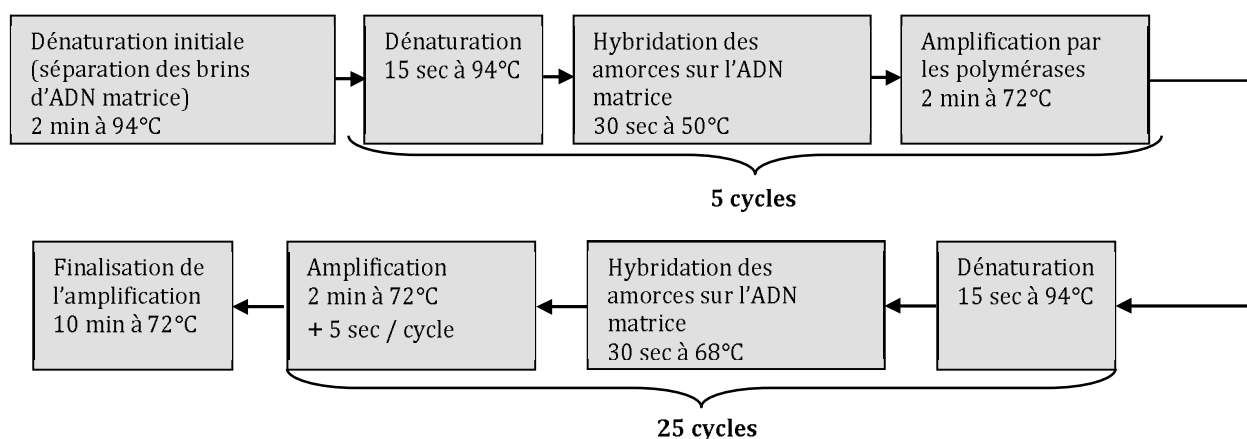
Ces ADNc ont été amplifiés par PCR avec des amorces permettant d'ajouter une séquence codant pour le tag FLAG, placée en aval du codon Start de *mnd* (tag en N-ter) ou codant pour le tag HA, placée en amont du codon Stop de *CD98hc* (tag en C-ter) (Tableau XXV). Ces tags de 8 et 9 acides aminés ont été choisis en se basant sur les travaux de Campbell et Thompson qui ont sur-exprimé la chaîne légère LAT1 taguée avec FLAG en N-ter et la chaîne lourde CD98hc taguée avec HA en C-ter dans des hépatocytes de souris et qui ont obtenu des transporteurs fonctionnels (Campbell et Thompson, 2001). De plus, les travaux de Fenczik et collaborateurs suggèrent que l'ajout de trois Glycines (acide aminé de faible encombrement stérique) entre la chaîne lourde CD98hc de mammifère et le tag HA permettrait à l'anticorps anti-HA de mieux accéder à ce tag (Fenczik *et al.*, 2001). Par ailleurs, afin d'améliorer l'initiation de la traduction, une séquence de Kozak a été placée en amont du codon Start de *mnd* et *CD98hc* (Cavener, 1987).

**Tableau XXV : Caractéristiques des différentes amorces utilisées pour l'amplification des ADNc de *mnd* et de *CD98hc***

La séquence de Kozak est soulignée, les codons Start et Stop sont en gras, les séquences codant pour les tags FLAG ou HA sont indiquées en bleu et la séquence codant pour trois glycines successives est indiquée en vert.

Nom amorce	Séquence (5'-3')	T° de fusion théorique (T <sub>m</sub> )	Taille du fragment
Kozak-Flag- <i>mnd</i> -for	<u>CAACATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG</u> GGCGGAGTTCAGGCCAGC	68°C	1528 pb
<i>mnd</i> -rev	CTAGTCGAACTTCTCTGGTTGG	59,7°C	
Kozak-CD98hc-for	<u>CAACATGGTCCAGGATGAGAAGG</u>	57,4°C	1738 pb
CD98hc-3Gly-HA-rev	TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATCCACCGCCCTCCGCCTTCACTGGCA	62,2°C	

Après plusieurs ajustements, les cycles de PCR détaillés dans la Figure 27 ont été retenus pour l'amplification des ADNc de *mnd* et *CD98hc* en utilisant le kit « High Fidelity PCR Enzyme Mix » de Fermentas.

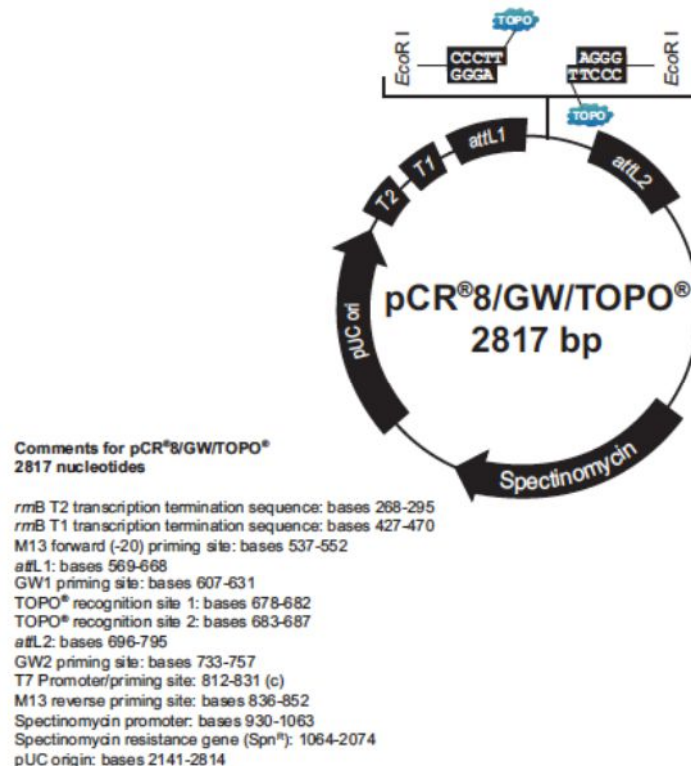


**Figure 27 : Programme de PCR utilisé pour amplifier les ADNc de *minidiscs* et de *CD98hc***



L'amplification correcte des fragments a été vérifiée par électrophorèse. Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés des autres composants du mélange de PCR par excision des bandes d'intérêt sur gel et en utilisant le kit « NucleoSpin®Extract II » de Macherey-Nagel selon les instructions du fournisseur.

Les fragments amplifiés par PCR ont été clonés dans pCR8 (Invitrogen) en suivant les instructions détaillées dans le kit « pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® » (Figure 28).



**Figure 28 : Structure du vecteur pCR8**

Des bactéries compétentes (*E. coli*, One Shot® TOP10) ont été transformées avec ces constructions plasmidiques selon les instructions du fournisseur (Invitrogen). Après extraction d'ADN plasmidique, différents tests de restriction ont été réalisés pour vérifier la présence et le sens de l'insert dans les plasmides. Les colonies ayant bien intégré le plasmide contenant l'insert dans la bonne orientation ont été remises en culture. L'ADN plasmidique a été extrait de ces bactéries en utilisant le kit « Nucleospin Plasmid Quick-Pure » de Macherey –Nagel (selon le protocole fourni).

Le transfert des inserts clonés dans pCR8 vers le vecteur d'expression pMT-DEST 48 (Figure 26) a été obtenu par recombinaison entre les sites attL1 et attL2 de pCR8 et les sites attR1 et attR2 de pMT-DEST 48 en utilisant le kit « Gateway LR Clonase II Enzyme Mix » d'Invitrogen selon les instructions fournies.

Après transformation de bactéries « One Shot® TOP10 », extraction d'ADN plasmidique et réalisation de différents tests de restriction, les colonies ayant bien intégré le plasmide contenant l'insert dans la bonne orientation ont été remises en culture afin d'obtenir un grand nombre de copies de ces constructions plasmidiques. L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries en utilisant le kit « Promega Pure Yield Plasmid MIDI prep system » (selon le protocole fourni) afin d'obtenir un niveau de purification compatible avec la transfection en cellules S2. Ces constructions ont ensuite été vérifiées par séquençage.

### *c.3) Méthode de transfection*

Trente heures avant la transfection, les cellules S2 sontensemencées dans des puits de plaques 12 puits avec 1 mL de suspension cellulaire à 0,5 million de cellules/mL préparée dans du milieu de Schneider contenant 10% de SVF et des antibiotiques.

La procédure de transfection a été adaptée depuis le protocole fourni par Promega pour le « FuGENE® HD Transfection Reagent » afin d'obtenir la meilleure efficacité de transfection (évaluée par analyse de populations de cellules transfectées dans différentes conditions par cytométrie en flux). Au terme de ces mises au point, le protocole détaillé ci-dessous a été retenu.

Un mix est préparé pour chaque transfection, en ajoutant les différents réactifs dans l'ordre suivant :

- 33 µL de milieu de culture sans sérum (les lipides présents dans le SVF peuvent diminuer l'efficacité de l'agent lipidique utilisé pour la transfection)
- le plasmide stérile (0,5 µg pour pMT-*CD98hc*-HA, 1 µg pour pMT-FLAG-*mnd* et 0,5 µg de chaque plasmide dans le cas d'une co-transfection)
- le Fugène (ratio Fugène:ADN de 4,5:1)
- 300 µL de milieu de culture sans sérum

Ce mix est immédiatement transféré sur les cellules après les avoir préalablement lavées avec 1 mL de milieu sans sérum. Après 17 heures d'incubation à 28°C, le mix de transfection contenant le plasmide et le Fugène est remplacé par 1 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF. Puis après 8 heures d'incubation supplémentaires, les cellules sont induites pendant 21 heures avec 0,5 mM de sulfate de cuivre. Dans le cas des expériences d'immunocytologie et de transport de leucine radiomarquée (*cf.* Parties 4-c et 5 du matériel et méthodes), les cellules sont transférées en plaque 24 puits quelques heures avant l'induction (1 mL de suspension cellulaire à 0,5 million de cellules/mL par puits).

## Partie 3 : Étude génomique et transcriptionnelle

### a) Extraction d'ADN génomique

#### *a.1) À partir de drosophiles adultes ou de pupes*

Après avoir placé une vingtaine de drosophiles adultes ou de pupes dans un tube de 1,5 mL à -80°C pendant 10 minutes, celles-ci sont broyées dans 200 µL de tampon d'homogénéisation (0,1 M EDTA pH 8; 0,1 M Tris-HCl pH 9 ; SDS 1%) à l'aide d'une bille de tungstène en les plaçant dans un TissueLyser (QIAGEN) pendant 1 minute à 30 Hertz. Le broyat est ensuite incubé à 70°C pendant 30 minutes. Après ajout de 28 µL d'une solution d'acétate de potassium 8 M, le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace, puis centrifugé à 14000g, 10 minutes à 4°C. Afin d'obtenir un surnageant limpide, l'étape suivante est réalisée deux fois. Un volume de 120 µL d'isopropanol (précipitation des acides nucléiques) est ensuite ajouté au surnageant préalablement placé dans un nouveau tube. Il est important de mélanger les tubes par inversion sans les vortexer afin de préserver l'intégrité de l'ADNg. Ce mélange est ensuite placé 10 minutes à -80°C puis centrifugé à 14000g, 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70% puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Une fois sec, le culot est dissous dans 30 µL de Tris-EDTA pH 8, dosé à 260nm puis stocké à 4°C ou à -20°C.

#### *a.2) Extraction rapide à partir de larves*

Une larve est placée dans un tube de 200 µL avec 10 µL de tampon d'extraction (10 mM Tris pH 8,2 ; 1 mM EDTA ; 25 mM NaCl) auquel est ajoutée extemporanément la protéinase K (200 µg/mL) permettant d'inactiver les DNases. La larve est broyée dans ce tube à l'aide d'une pointe de P200 dont l'extrémité a été aplatie. Le broyat est incubé 30 minutes à 37°C puis 5 minutes à 95°C avant d'être stocké à 4°C. Généralement, 1 µL de ce mélange est suffisant pour une réaction de PCR.

### b) Extraction d'ARN

#### *b.1) À partir de têtes de drosophiles*

Des individus âgés de 4 à 9 jours sont placés dans des tubes de 1,5 mL puis congelés dans de l'azote liquide afin de rendre les tissus cassants et de préserver les ARN (3 tubes de 60 mâles et 3 tubes de 60 femelles sont préparés pour chaque génotype). Ces tubes sont ensuite placés pendant 30 secondes sur un agitateur afin de séparer les tissus par friction mécanique. Le contenu de chaque tube est transféré sur un tamis dont le maillage permet de laisser passer seulement les têtes des drosophiles.

Les têtes sont récupérées puis immédiatement broyées dans 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol® (Invitrogen) à l'aide d'une bille de tungstène en plaçant les tubes dans un TissueLyser (QIAGEN) (1 minute 30 Hertz). Le TRIzol® est une solution de phénol et de guanidine isothiocyanate (agent chaotropique) permettant de lyser les cellules et de dénaturer les protéines (dont les RNases) tout en gardant l'intégrité des ARN lors de l'homogénéisation.

Les échantillons sont ensuite laissés 5 minutes à température ambiante afin de permettre une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Puis 50  $\mu\text{L}$  de BCP (1-bromo-3-chloropropane) sont ajoutés aux homogénats et mélangés par inversion des tubes. Les échantillons sont laissés 10 minutes à température ambiante puis centrifugés à 12000g, 15 minutes à 4°C. Après centrifugation, la phase aqueuse contenant les ARN (solubles dans l'eau) est transférée dans de nouveaux tubes puis les ARN sont précipités par ajout de 250  $\mu\text{L}$  d'isopropanol. Après avoir été mélangés par inversion, les échantillons sont laissés 10 minutes à température ambiante puis centrifugés à 12000g, 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé, le culot est lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 70% puis centrifugé à 7500g, 5 minutes à 4°C. L'éthanol est éliminé et les culots sont séchés à l'air libre avant d'être resuspendus dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free. Les ARN sont quantifiés à 260 nm puis stockés à -80°C.

### *b.2) À partir de cellules S2*

Après avoir homogénéisé 4 millions de cellules dans 1mL de TRIzol®, celles-ci sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. Un volume de 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme est ensuite ajouté à l'échantillon qui est ensuite mélangé par inversion. Après une nouvelle incubation de 5 minutes à température ambiante, ce mélange est centrifugé à 12000g, 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse est alors placée dans un nouveau tube contenant 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol permettant la précipitation des acides nucléiques. Après mélange par retournement, les échantillons sont incubés 15 minutes à température ambiante puis centrifugés à 12000g, 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70% puis centrifugé à 12000g, 5 minutes à 4°C. Une fois sec, le culot est dissous dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free. Les ARN sont ensuite quantifiés à 260 nm puis stockés à -80°C.

### **c) Rétro-Transcription**

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique, 2  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux sont incubés 35 minutes à 37°C en présence de 2  $\mu\text{L}$  de DNase I (50 u/ $\mu\text{L}$ ; Fermentas) et de son tampon dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$ . La réaction est stoppée par ajout de 2  $\mu\text{L}$  d'EDTA 0,5

M puis par incubation 10 minutes à 67°C (inactivation thermique de la DNase). La rétro-transcription des ARN totaux est ensuite réalisée en mettant 1 µg d'ARN (10 µL du mélange réactionnel après l'étape de DNase) en présence de 1 µL de Reverse Transcriptase (kit Iscript, Biorad) et 4 µL de 5x iScript reaction mix (contenant le tampon de l'enzyme et un mélange d'amorces hexamériques et d'oligo(dT)) dans un volume réactionnel de 20 µL. Ce mélange est incubé 5 minutes à 25°C (hybridation des amorces sur les ARN), puis 30 minutes à 42°C (synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN par la Reverse Transcriptase) et enfin 5 minutes à 85°C (inactivation thermique de l'enzyme).

#### d) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Plusieurs PCR ont été réalisées à des fins analytiques soit à partir d'ADNg (PCR classique) soit à partir d'ADNc produit à partir d'ARN extraits de têtes de drosophiles (RT-PCR). Dans les deux cas, les éléments suivants ont été utilisés pour la réaction de PCR en suivant le protocole fourni avec la Taq DNA Polymérase par Eurogentec :

- l'ADNg ou l'ADNc de drosophile servant de matrice pour l'amplification,
- la Taq DNA polymérase,
- le tampon supplémenté en MgCl<sub>2</sub> fourni avec l'enzyme,
- les amorces sens et antisens (Tableau XXVI et Tableau XXVII),
- un mélange des 4 dNTPs.

Les cycles réalisés pour l'amplification sont les mêmes que ceux détaillés dans la Figure 18 pour le « High Fidelity PCR Enzyme Mix » (cf. Partie 1-e.1 du matériel et méthodes). La température d'hybridation et la durée d'amplification ont été adaptées pour chacune des réactions PCR (Tableau XXVI et Tableau XXVII). La taille des fragments obtenus au terme de ces différentes réactions a été visualisée après migration par électrophorèse sur un gel d'agarose à 10%.

**Tableau XXVI : Liste des amorces utilisées en PCR**

Nom amorce	Séquence (5'-3')	T° de fusion théorique (T <sub>m</sub> )	Taille du fragment	T° d'hybridation et Temps d'élongation
<i>mnd</i> -A-for	AGGCGCTACACTTGCTTTGT	60,1°C	943 pb	53°C 1 minute
<i>mnd</i> <sup>601921</sup> -A-rev	CCCCTCTAAAATAAGGCGAAA	59,6°C		
<i>mnd</i> <sup>702785</sup> -B-for	CCGATAAAACACATGCGTCA	60,5°C	727 pb	
<i>mnd</i> -B-rev	CGCCTGATTTGGGTATCATC	60,3°C	1279 pb	55°C 1 minute 30 secondes
<i>mnd</i> -C-for	GCATGTTTCGGTGGAAAGTT	60,0°C		
<i>mnd</i> -C-rev	TTGTGCTGTGTTTGCTACAGG	60,0°C		
<i>mnd</i> -D-for	ATGCGATTACGGCTCTGACT	59,9°C	1083 pb	
<i>mnd</i> -D-rev	CGTGCAAGAGAAGATGACCA	60,0°C		

Tableau XXVII : Liste des amorces utilisées en RT-PCR

Nom amorce	Séquence (5'-3')	T° de fusion théorique (T <sub>m</sub> )	Taille du fragment	T° d'hybridation et Temps d'élongation
<i>mnd-RD for</i>	TTCTCCCTCTATCGGAACCA	59,6°C	114 pb	60°C 30 secondes
<i>mnd-RD rev</i>	GGAGGAACCTCGAACACCT	59,1°C		
<i>mnd-RC for</i>	TGGGTAACGGTTCTCCCTCT	60,9°C	183 pb	
<i>mnd-RC rev</i>	AGCGTGGAGCTTCCAATACA	60,8°C	111 pb	
<i>mnd-RA for</i>	GTGCGTTCATCCGATATTC	60,3°C		
<i>mnd-RA rev</i>	TCCACGTGGTTCTATCATGTTC	59,9°C	95 pb	
<i>mnd-commun for</i>	GGACAATCCCTCATCGTTTG	60,3°C		
<i>mnd-commun rev</i>	CCTGATTTGGGTATCATCGTG	60,2°C	548 pb	
<i>mnd-RE for</i>	GGAGCTGGCAGTTATTGCTT	59,5°C		
<i>mnd-RE rev</i>	TTTCGGTACGGATCCTTGAG	60,1°C	158 pb	58°C 30 secondes
<i>CD98hc-for</i>	GTTCGGTGGGATTGAAGATG	60,3°C		
<i>CD98hc-rev</i>	CGAGGAGACCTACAGGCAGA	60,5°C	150 pb	
<i>CD98hc-RDfor</i>	TTCCAGACTTGATCCTCTGC	57,9°C		
<i>CD98hc-RDrev</i>	TGGATGCTGTGGCTTATCAA	60,2°C	100 pb	
<i>CG13840-for</i>	CAGTGTCAAGTGGGGCCATA	60,5°C		
<i>CG13840-rev</i>	CTGGAACATGGCAGCAAAC	60,3°C	100 pb	
<i>Mal-A5for</i>	CAGCACATGCCCAAAGGT	60,7°C		
<i>Mal-A5rev</i>	TTAGCATGTCCACACGATCC	59,5°C	108 pb	
<i>Mal-A5-RAfor</i>	CAGTCGCATTTGTCTTCTGC	59,6°C		
<i>Mal-A5-RArev</i>	CACTGCCAAGAACGCTATCA	60,0°C	150 pb	
<i>Mal-A5-RBfor</i>	TAAGTTGCTTGGCAGGCATC	61,3°C		
<i>Mal-A5-RBrev</i>	TTCCGAAAATAGGAGCAATCTC	59,7°C	103 pb	
<i>Mal-B2for</i>	AGTCCGAACACCGTTCAGT	61,9°C		
<i>Mal-B2rev</i>	AAGGTTGAGCTCGAGGTAGTTC	59,1°C	100 pb	
<i>Mal-B2-RAfor</i>	CAGATGCTAAAAACGCATCG	59,5°C		
<i>Mal-B2-RArev</i>	CTTAACCAGACCGCCATAA	60,0°C	108 pb	
<i>Mal-B2-RCfor</i>	CGCTGTCCAGTGGTAATGAA	59,7°C		
<i>Mal-B2-RCrev</i>	CCAAGTGTCTGGGCAAGTT	60,1°C		

### e) PCR quantitative (qPCR)

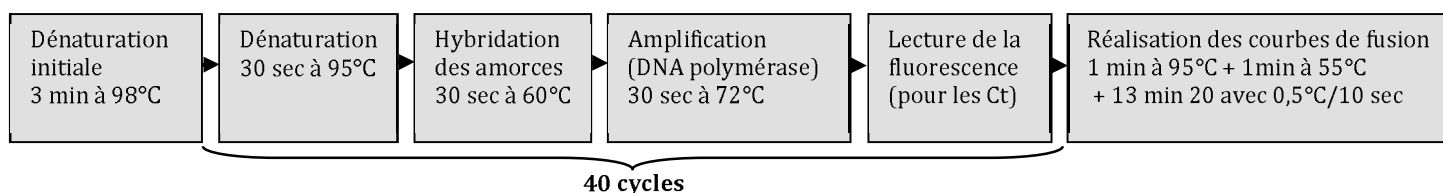
La qPCR est une méthode permettant la quantification relative du taux d'expression d'un gène cible (*mnd* par exemple) par rapport à celui d'un gène de référence (*tubuline* ou *cyclophiline*). Cette méthode utilise le même principe de base que la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN par une polymérase) mais en mesurant la quantité de produits formés tout au long de la réaction plutôt qu'à la fin (plateau). En effet, la quantité d'ADN est mesurée à chaque cycle d'amplification grâce à un marqueur fluorescent (SYBR Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. La quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié est alors évaluée en déterminant le cycle seuil Ct (Cycle threshold) à partir duquel la fluorescence est détectable. Le SYBR Green est un agent intercalant dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin. La spécificité de la réaction ne repose donc que sur la spécificité des amorces (Tableau XXVIII), qui a été vérifiée en réalisant des

BLAST avec la séquence de ces amorces sur le génome de drosophile et en s'assurant que seul le gène cible est bien reconnu (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tableau XXVIII : Liste des amorces utilisées en qPCR**

Nom amorce	Séquence (5'-3')	T° de fusion théorique (T <sub>m</sub> )	Taille du fragment
<i>tubuline</i> for	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	60,9°C	111 pb
<i>tubuline</i> rev	AGCAGTAGAGCTCCCAGCAG	59,9°C	
<i>cyclophiline</i> for	GAGACTGCTGAACAATGC	52,3°C	79 pb
<i>cyclophiline</i> rev	GTCGCTGTGATTCGTAGT	51,7°C	
<i>mnd</i> -commun for	GGACAATCCCTCATCGTTTG	60,3°C	95 pb
<i>mnd</i> -commun rev	CCTGATTTGGGTATCATCGTG	60,2°C	
<i>gb</i> -commun for	AAAGAGCTACACCCCACTGC	59,4°C	105 pb
<i>gb</i> -commun rev	ACAATGCTGGCGTAGGTGAT	60,5°C	
<i>Jhl-21</i> -commun for	AGCATAGCCGGAATGTTGTG	61,1°C	103 pb
<i>Jhl-21</i> -commun rev	TCACGCAGCTTACCATGAAG	60°C	
<i>CD98hc</i> -commun for	AGTTCGAACCCCGAAAAAGT	59°C	175 pb
<i>CD98hc</i> -commun rev	AGGGTCGTTGGCGTACTTC	60°C	

Le mélange réactionnel de la qPCR contient 10 µL d'iQ SYBR Green Supermix (contenant l'iTaq DNA polymérase, le tampon de l'enzyme, des dNTP, du MgCl<sub>2</sub> et du SYBR Green I ; kit Biorad), 8 µL d'eau, 1 µL d'un mélange d'un couple d'amorces à 10 µM et 1 µL d'ADNc obtenu après l'étape de reverse transcription. Les différentes étapes du programme de qPCR réalisées avec l'iCycler MyiQ™ de Biorad sont détaillées dans la Figure 29.



**Figure 29 : Programme utilisé pour les qPCR**

Pour chaque condition ou génotype testé, trois réplicats sont effectués pour chacun des trois échantillons indépendants. L'abondance relative en ARNm est calculée en utilisant la méthode des « $\Delta\Delta Ct$ » (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). La quantité de transcrits d'un gène cible (*mnd*, *gb*, *Jhl-21* ou *CD98hc*) est normalisée par rapport à un gène de référence endogène (*tubuline*, *cyclophiline* ou *RP49*) et de façon relative à des individus témoins (drosophiles *w<sup>1118</sup>* ou cellules sans traitement). La quantité de transcrits du gène cible est alors égale à  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condition testée}} - \Delta Ct_{\text{témoin}}$  et  $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence}}$ .

Pour que les calculs de quantification du taux relatif de transcrits d'un gène par la méthode des « $\Delta\Delta Ct$ » soit valide, l'efficacité d'amplification du gène cible et l'efficacité d'amplification du gène de référence endogène doivent être approximativement égales. La

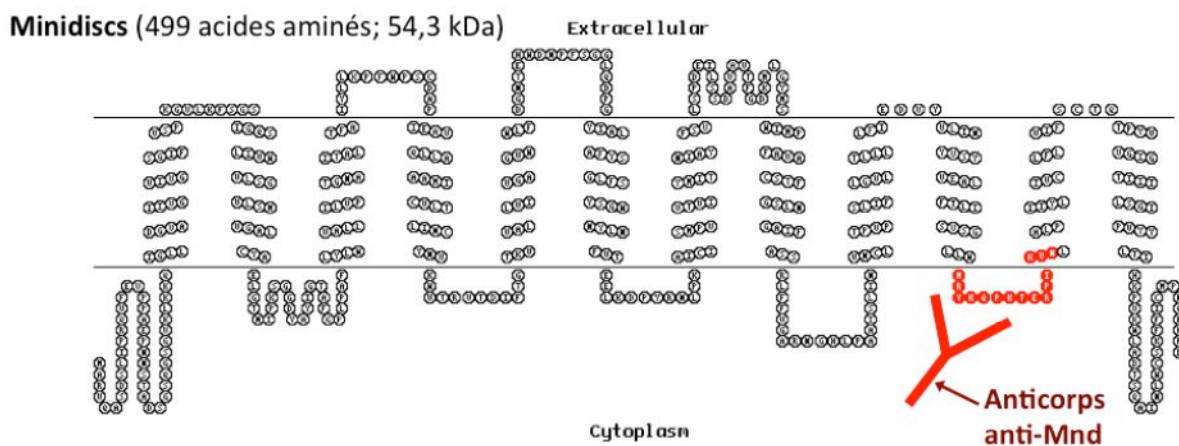
méthode utilisée pour vérifier si ces efficacités sont similaires est d'observer comment les  $\Delta Ct$  varient en fonction de dilutions croissantes pour le gène cible et le gène de référence (*mnd* et *tubuline* par exemple). Parmi les trois gènes de référence testés (*tubuline*, *cyclophiline* et *RP49*), la *tubuline* est le gène de référence dont l'efficacité d'amplification est la plus proche de celle de *mnd* et a donc été choisie pour les quantifications suivantes.

Dans le cas des qPCR réalisées à partir de têtes de drosophiles de différents génotypes, les données ont été analysées statistiquement avec une one-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey après avoir vérifié que les valeurs suivent une loi normale (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc), en comparant entre eux les  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$  obtenus pour chaque génotype.

#### Partie 4 : Immunochimie

##### a) Anticorps utilisés

Un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-Mnd a été généré contre un antigène de séquence peptidique MRYKQPKTERPIKVN (Open Biosystem antibody design ; Figure 30).



**Figure 30 : Représentation schématique de Minidiscs et de la séquence peptidique reconnue par l'anticorps anti-Mnd (en rouge)**

Ce peptide correspond aux acides aminés 409 à 423 de la protéine Mnd. Ce peptide est situé dans le domaine intracellulaire reliant le 10<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> domaine transmembranaire de Mnd (prédiction selon l'Algorithme TMHMM server v.2.0 ; [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)). Deux lapins différents sont à l'origine des lots 61A1 et 61A2. Cet anticorps a été utilisé au 1 :250<sup>ème</sup> en immunohistologie, en immunocytologie



et en cytométrie en flux et au 1:100<sup>ème</sup> lors des expériences de Western Blot après détermination de sa dilution optimale.

L'ensemble des autres anticorps primaires et secondaires utilisés lors des différentes expériences d'immunochimie est détaillé dans le Tableau XXIX et le Tableau XXX respectivement.

**Tableau XXIX : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistologie, immunocytologie, Western Blot (WB) et/ou cytométrie en flux**

Anticorps primaires	Type / Espèce	Dilution	Provenance
anti-Mnd (61A1 et 61A2)	Polyclonal / Lapin	1/250 (1/100 en WB)	Open Biosystem
anti-CD98hc (SYC723)	Polyclonal / Cobaye	1/500	Eurogentec
anti-GFP	Monoclonal / Souris	1/500	Sigma
anti-GFP	Monoclonal / Lapin	1/500	Invitrogen
anti-ElaV	Monoclonal / Souris	1/1000	DSHB
anti-Repo	Monoclonal / Souris	1/10	DSHB
anti-nc82	Monoclonal / Souris	1/10	DSHB
anti-FasII	Monoclonal / Souris	1/20	DSHB
anti-FLAG	Monoclonal / Souris	1/250 (1/2500 en WB)	Sigma
anti-HA	Monoclonal / Lapin	1/100 (1/2500 en WB)	Sigma

**Tableau XXX : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunohistologie, immunocytologie, Western Blot et/ou cytométrie en flux**

Anticorps secondaires	Type / Espèce	Dilution	Provenance
anti-IgG de souris couplé à Alexa 488	Polyclonal / Chèvre	1/400	Molecular probes
anti-IgG de lapin couplé à Alexa 488	Polyclonal / Chèvre	1/400	Molecular probes
anti-IgG de cobaye couplé à Alexa 488	Polyclonal / Chèvre	1/400	Molecular probes
anti-IgG de souris couplé à Alexa 594	Polyclonal / Chèvre	1/400	Molecular probes
anti-IgG de lapin couplé à Alexa 594	Polyclonal / Chèvre	1/400	Molecular probes
anti-IgG de souris couplé à la HRP	Monoclonal / Chèvre	1/30000	Santa Cruz
anti-IgG de lapin couplé à la HRP	Monoclonal / Chèvre	1/30000	Santa Cruz

## b) Immunohistologie sur cerveaux de drosophiles

### *b.1) Dissection et marquage sur cerveaux in toto de drosophiles*

Après avoir nettoyé les drosophiles à disséquer (âgées de 1 à 3 jours) dans de l'éthanol 70%, celles-ci sont placées dans du PBS-T (Triton X-100 à 0,2% dans du PBS) et leurs appendices (proboscis, pattes, ailes) sont retirés afin de faciliter l'imprégnation des tissus lors de l'étape de fixation. Lors de cette étape, les drosophiles sont placées pendant 40

minutes dans une solution de paraformaldéhyde (PFA à 4% dans du PBS-T) qui permet de fixer les tissus grâce à la création de liaisons covalentes entre les groupements  $-NH_2$  des protéines. Après deux rinçages rapides puis deux lavages de 30 minutes dans du PBS-T, les cerveaux sont disséqués à l'aide d'une loupe binoculaire et de pinces de dissection (Pinces Dumont modèle Suisse n°5F ; Moria).

Les cerveaux sont ensuite incubés pendant 30 minutes dans une solution de blocage (sérum de chèvre (NGS) à 5% dans du PBS-T) afin de saturer les sites de fixation non spécifiques. Cette solution est ensuite remplacée par une solution contenant les anticorps primaires dilués dans une solution de NGS à 2% dans du PBS-T pendant 16-18 heures à 4°C. Après trois lavages de 30 minutes dans du PBS-T, les cerveaux sont à nouveau placés pendant 30 minutes dans une solution de NGS à 5% dans du PBS-T. Puis cette solution est remplacée par une solution contenant les anticorps secondaires dilués dans une solution de NGS à 2% dans du PBS-T pendant 18-24 heures à 4°C. Après trois nouveaux lavages de 30 minutes dans du PBS-T, les cerveaux sont placés sur une lame de microscope avec 10 à 20  $\mu$ L de VECTASHIELD® H-1000 Mounting Medium afin de prévenir l'extinction de la fluorescence, puis sont protégés par une lamelle lutée au vernis à ongle.

### *b.2) Cryosection et marquage sur coupes de têtes de drosophiles*

Après avoir retiré leurs appendices comme précédemment, des drosophiles (âgées de 1 à 3 jours) sont fixées pendant 3h à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde (PFA à 4% dans du PBS-T). Les drosophiles sont ensuite placées pendant 16h à 4°C dans un tampon de dissection composé d'une solution de Ringer (182 mM KCl ; 46 mM NaCl ; 3 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ; 10 mM Tris-HCl ; pH 7,2) et de 25% m/v de sucrose, ce qui permet d'éliminer le PFA et de protéger les tissus. Les drosophiles sont alors décapitées et leur têtes sont placées dans un gel (Tissue-Tek®-O.C.T.™, Sakura) puis immergées dans de l'Azote liquide. Des sections de 14  $\mu$ m sont alors réalisées au cryostat (Leica CM 3050) et déposées sur des lames de microscope « SuperFrost® Plus » (Menzel).

Les sections sont rincées 2 fois 10 minutes avec une solution de TBS-T (Triton à 2,5% dans du TBS (10mM Tris-HCl ; 150mM NaCl ; pH 8)) et les sites de fixation non spécifiques sont saturés par une solution de NGS à 5% dans du TBS-T pendant 30 minutes. Les sections sont ensuite placées 24h à 4°C avec la solution d'anticorps primaires, rincées 2 fois 10 minutes avec une solution de TBS-T puis placées 16h à 4°C avec la solution d'anticorps secondaires. Les anticorps sont dilués dans une solution de NGS à 2% dans du TBS-T.

Les sections sont ensuite recouvertes de VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium afin de prévenir l'extinction de la fluorescence, puis protégées par une lamelle.

### c) Immunocytologie sur cellules S2 de drosophiles

Les cellules sontensemencées dans des puits de plaques 24 puits contenant 1 mL de milieu de culture et dans lesquels une lamelle en verre de 12 mm de diamètre a été placée. Ces lamelles ont été au préalable traitées 5 minutes avec une solution aqueuse de poly-L-lysine 0,01% (Sigma) puis rincées avec du PBS avant d'être laissées à sécher au minimum 1 heure. Après 24 heures de culture, les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS puis fixées avec une solution de PFA à 1% dans du PBS pendant 10 minutes. Afin d'éliminer les groupements aldéhydes libres, les lamelles sont rincées 3 fois dans du PBS, puis 2 fois 5 minutes dans du PBS / glycine 0,1 M afin de diminuer l'autofluorescence des cellules. Après 3 nouveaux rinçages dans du PBS, les membranes cellulaires sont perméabilisées 10 minutes à température ambiante avec la solution Cytoperm « FACS permeabilizing solution 2» (BD-Bioscience), puis rincées 3 fois dans du PBS-S (PBS / saponine 0,05%). Les lamelles sont ensuite incubées pendant 20 minutes à température ambiante avec les anticorps primaires dilués dans du PBS-S. Trois rinçages en PBS-S sont effectués afin d'éliminer les anticorps non fixés. Une incubation avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS-S est ensuite effectuée à l'obscurité pendant 20 min à température ambiante. Trois rinçages dans du PBS sont alors effectués avant de marquer les noyaux au Hoechst 33342 (life technologies) à 2 µg/mL pendant 5 minutes à température ambiante. Enfin, trois rinçages avec du PBS sont effectués avant de monter les lamelles avec du « Fluorescence Mounting Medium » (Dako) sur des lames de microscope en les lutant au vernis à ongle.

### d) Microscopie confocale et traitement des images

Ces préparations sont observées au microscope confocal (Leica TCS SP2 AOBS). Les anticorps secondaires utilisés lors des marquages sur cerveaux de drosophiles ou sur cellules S2 sont couplés à Alexa 488 ou à Alexa 594. La visualisation de la fluorescence de ces deux types de fluorochromes s'effectue en illuminant séquentiellement les échantillons à 488 nm et à 594 nm. Les deux images obtenues respectivement par émission au voisinage de 519 nm et 617 nm sont ensuite superposées en utilisant le logiciel Fiji (ImageJ 1.46a).

### e) Western Blot

#### *e.1) Extraction de protéines à partir d'un lysat de drosophiles*

Après avoir placé une cinquantaine de drosophiles dans un tube de 1,5 mL à -80°C pendant 10 minutes, celles-ci sont broyées dans 1mL de tampon lyse (150 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl pH 8 ; Triton X-100 1% ; SDS 0,1% ; inhibiteurs de protéases Roche et PMSF 1 mM) à l'aide d'une bille de tungstène et d'un TissueLyser (QIAGEN). Le broyat est ensuite

centrifugé à 1000g, 5 minutes à 4°C. Le surnageant, après avoir été placé dans un nouveau tube, est placé à 4°C pendant 30 minutes avant d'être centrifugé à 20000g, 10 minutes à 4°C. Après avoir récupéré un aliquot de 30 µL (pour le dosage de protéines), quatre volumes d'acétone sont ajoutés au surnageant préalablement placé dans un nouveau tube. Ce mélange est ensuite placé à -20°C pendant 1 heure avant d'être centrifugé à 15000g pendant 10 minutes à 4°C. L'acétone entraîne la précipitation des protéines ce qui permet de délipider les échantillons (les lipides provenant du tissu adipeux des drosophiles gênant la migration des protéines sur gel). Après avoir retiré l'acétone, le culot de protéines est immédiatement resuspendu dans du tampon Laemmli 2X (8M urée ; 700 mM β-mercaptoéthanol ; SDS 2% ; glycérol 10% ; 125 mM Tris-HCl pH 6,8 et bleu de bromophénol) à raison de 150 µL de tampon par mg de protéine.

### *e.2) Extraction de protéines à partir d'un lysat de cellules S2*

Après comptage, 25 millions de cellules sont centrifugées à 300g pendant 5 minutes à 4°C, puis sont lavées deux fois avec du PBS à 4°C. Le culot de cellules est alors resuspendu dans 1 mL de tampon lyse (150 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl pH 8 ; Triton X-100 1% ; inhibiteurs de protéases Roche et PMSF 1 mM) puis laissé 30 minutes à 4°C. Le lysat est alors centrifugé à 20000g pendant 10 minutes à 4°C puis le surnageant est placé dans un nouveau tube.

### *e.3) Dosage de protéines*

Les protéines totales sont dosées en plaque 96 puits selon la méthode de Lowry à l'aide du kit de dosage « DC Protein Assay » (Biorad). Chaque puits contient 5 µL de lysat protéique à doser, 25 µL de réactif A' (réactif cuivrique alcalin) et 200 µL de réactif B (réactif de Folin). Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750 nm. Les dosages sont réalisés en triplicat. La réaction est également effectuée en parallèle sur une gamme étalon de SAB (Serum Albumine Bovine) avec des quantités de SAB de 0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 µg dilués dans un volume final de 4 µL d'eau auquel est ajouté 1 µL de tampon de lyse.

### *e.4) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de PVDF*

Les lysats protéiques sont dénaturés dans du tampon Laemmli 2X (8M urée ; SDS 2% ; glycérol 10% ; 125mM Tris-HCl pH 6,8 et bleu de bromophénol) avec ou sans agents réducteurs (700 mM β-mercaptoéthanol ; 200 mM dithiothréitol (DTT)). Les protéines contenues dans ces échantillons ainsi que le marqueur de taille (« Precision Plus protein standards » ; Biorad) sont séparés en fonction de leur masse moléculaire sur un gel de

polyacrylamide (gel de concentration : acrylamide:bisacrylamide 37,5:1 à 3,5% ; 2M Tris-HCl pH 6,8 ; SDS 0,05 % ; APS 1 % ; TEMED 0,78 µg/mL et gel de séparation : acrylamide:bisacrylamide 37,5:1 7,5% ; 1,5M Tris-HCl pH 8,8; SDS 0,5% ; APS 0,5% ; TEMED 0,78 µg/mL). La migration s'effectue pendant environ 1h30 à 25mA/gel dans du tampon de migration (25mM Tris-HCl pH 8,8 ; 192mM glycine et SDS 0,1%) à l'aide d'un « Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System » (Biorad) permettant la réalisation d'électrophorèse verticale. Après migration, les protéines sont transférées depuis le gel de polyacrylamide sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) présentant l'avantage d'être adaptée aux protéines lipophiles tels que les protéines transmembranaires. Ce transfert électrophorétique s'effectue pendant 1h à 100 V dans du tampon de transfert (50mM Tris-HCl ; 50mM acide borique) à l'aide d'un « Mini Trans-Blot® Cell » (Biorad).

#### *e.5) Immunodétection*

La membrane de PVDF est saturée pendant 30 min à température ambiante sous agitation dans du TBS-T (Tween 20 à 0,1% dans du TBS) avec 3% de lait écrémé (lait en poudre de la marque Régilait). La membrane est ensuite incubée avec une solution contenant l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T/ lait écrémé 3% à température ambiante pendant 30 minutes sous agitation. Après 5 lavages de 5 minutes dans du TBS-T, la membrane est incubée avec une solution contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP, « Horse Radish Peroxidase ») dilué dans du TBS-T / lait écrémé 3% pendant 30min à température ambiante sous agitation. Après 5 lavages de 5 minutes dans du TBS-T, la révélation des complexes antigènes/anticorps est obtenue par chimioluminescence (ECL « Enhanced Chemiluminescence Light » ; Amersham Biosciences). L'émission de lumière qui résulte de cette réaction est causée par l'oxydation du luminol présent dans l'ECL par la HRP qui est couplée aux anticorps secondaires.

Afin de pouvoir révéler une membrane avec un second anticorps primaire, celle-ci est « strippée » afin de dissocier les complexes antigènes/anticorps formés lors du premier marquage. La membrane est placée pendant 30 minutes à 60°C avec du tampon STRIP (100 mM β-mercaptoéthanol ; SDS 2% ; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) préalablement chauffé à 60°C afin d'améliorer la dissociation des complexes antigènes/anticorps. Après 5 lavages de 5 minutes dans du TBS-T, la membrane peut être réutilisée pour une nouvelle révélation.

### f) Cytométrie en flux

Les cellules sont détachées par pipetage et centrifugées 5 minutes à 300g avant d'être lavées avec du PBS. Après avoir répété une seconde fois cette étape de lavage, les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans 1 mL d'une solution de PFA à 1% dans du PBS. Les cellules sont à nouveau lavées avec du PBS à deux reprises. Le surnageant est éliminé et les membranes cellulaires sont perméabilisées 10 minutes à température ambiante avec 500  $\mu$ L de solution « FACS permeabilizing solution 2 » (BD-Bioscience). Après un nouveau lavage dans du PBS, le culot de cellules est repris dans 100  $\mu$ L d'une solution d'anticorps primaires dilués dans du PBS-S. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, deux lavages dans du PBS-S sont effectués. Les cellules sont alors incubées avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS-S, à température ambiante pendant 20 min à l'obscurité. Enfin, après un lavage dans du PBS, les cellules sont reprises dans 1 à 2 mL de PBS.

Les cellules sont ensuite analysées par un cytomètre en flux équipé de lasers argon émettant à 488 nm et à 594 nm (FACS Calibur, Laboratoire BioPeroxIL, Dijon). La fluorescence des fluorochromes Alexa 488 et Alexa 594 est collectée à l'aide de filtres à bande passante (FL1: 520 nm +/- 10 ; FL2 : 580 nm +/- 10) et le signal de fluorescence est représenté sur une échelle logarithmique. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo Inc).

## Partie 5 : Mesure de l'import de leucine radiomarquée dans les cellules S2

La leucine est le seul acide aminé transporté par Mnd identifié actuellement (Reynolds *et al.*, 2009). La leucine a donc été choisie pour les expériences de transport réalisées sur des cellules S2 en culture. Afin de pouvoir quantifier le transport de leucine dans les cellules, de la leucine tritiée a été utilisée.

Après avoir enlevé le milieu de culture des puits, les cellules sont rincées 3 fois avec une solution d'import sans sodium (125 mM choline-Cl ; 4,8 mM KCl ; 1,3 mM CaCl<sub>2</sub> ; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> ; 25 mM HEPES ; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 5,6 mM glucose ; pH 7,4). Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes dans 1 mL de cette solution avec ou sans 10 mM de BCH (inhibiteur des transporteurs d'acides aminés du système L). Lors de cette étape, le gradient de concentration entraîne les acides aminés présents dans les cellules vers le milieu extracellulaire. Cette solution est ensuite remplacée par 500  $\mu$ L de solution d'import sans sodium contenant de la leucine, dont une partie est radiomarquée (L-[3,4,5-<sup>3</sup>H(N)]-Leucine, Activité Spécifique : 100 à 150Ci/mmol; Perkin Elmer) avec ou sans 10 mM de

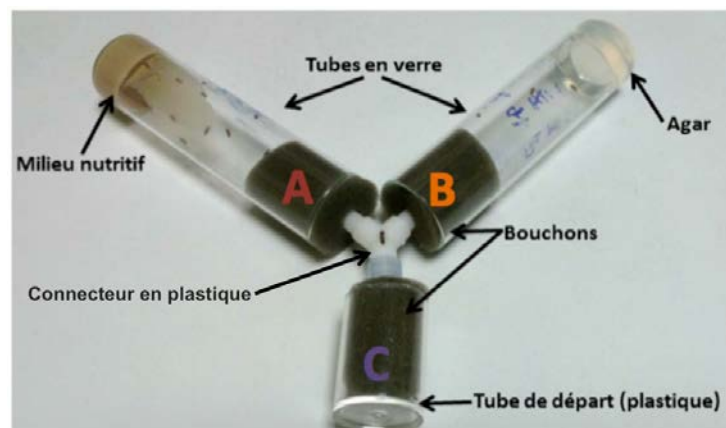
BCH et avec ou sans 2 mM d'acides aminés non radiomarqués dans le cas des expériences de compétition. Après 1 minute d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution d'import sans sodium contenant 20 mM de leucine non radiomarquée. Après avoir retiré cette solution, les cellules sont lysées dans 1mL de tampon de lyse (0,1% SDS ; 0,1% NaOH). Ce lysat est mélangé au 1/10<sup>ème</sup> à de l'Ultima Gold liquid scintillation fluid (Perkin Elmer) afin de mesurer le nombre de DPM (désintégrations par minute) de chaque échantillon à l'aide d'un compteur à scintillations (Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer ; Perkin Elmer).

Les valeurs obtenues ne suivant pas une loi normale (D'Agostino & Pearson omnibus normality test), les données ont été analysées statistiquement avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn pour comparer plusieurs conditions les unes aux autres et avec un test de Mann-Whitney pour comparer deux conditions l'une à l'autre. Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

## Partie 6 : Tests comportementaux

### a) Tests en Y et évaluation de la perception olfactive

Les tests de choix olfactif ont été réalisés sur des drosophiles adultes âgées de 4 à 9 jours. La réponse olfactive de ces mouches est testée en utilisant un dispositif en Y comportant un tube contenant 3 mL de milieu nutritif (1,5% d'agar-agar, 10% de levure de bière, 9% de farine de maïs et 0,4% de para-hydroxy-benzoate de méthyle) et un tube contenant 3 mL d'un milieu témoin sans nourriture (1,5% d'agar-agar et 0,4% de para-hydroxy-benzoate de méthyle) (Figure 31).



**Figure 31 : Dispositif en Y servant aux tests de choix olfactifs**

Un groupe de 20 drosophiles est placé dans le tube de départ (C). Les mouches sont libres d'aller soit dans un tube contenant de la nourriture (A) soit dans un tube sans nourriture (B) en empruntant un connecteur en plastique ne permettant pas de sortir du tube choisi.

Les drosophiles sont mises à jeûner pendant 16-18h dans un tube contenant du papier absorbant imbibé d'eau. Un groupe de 20 drosophiles est ensuite introduit par dispositif en les plaçant dans le tube de départ (C). Celles-ci sont laissées pendant 24h dans les dispositifs à 25°C en lumière rouge (ampoule à Led Orbitec, 625-630nm ; le spectre visuel des drosophiles (300 à 550 nm) ne leur permet pas de percevoir les longueurs d'ondes de la lumière rouge).

Le nombre de drosophiles présentes dans chaque tube est relevé au terme des 24h de test puis un indice olfactif est calculé ((nombre d'individus dans le tube contenant de la nourriture (A) – nombre d'individus dans le tube sans nourriture (B)) / nombre total d'individus présents dans le dispositif). Un indice olfactif positif indique un choix préférentiel des drosophiles pour le tube contenant de la nourriture alors qu'un indice olfactif nul indique qu'elles ne présentent pas de préférence pour l'un des tubes. Ce test est répété plusieurs fois par génotype (le nombre de répétitions (N) est précisé dans les résultats). Afin de comparer les indices olfactifs des différents génotypes, les résultats sont analysés statistiquement soit avec un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn lorsque les valeurs obtenues ne suivent pas une loi normale (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) soit avec une one-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey lorsque les valeurs présentent une répartition Gaussienne, sauf mention contraire (*cf.* Partie 2-c des résultats ; Figure 66). Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

Les mises au point associées à l'élaboration de ces tests de choix olfactifs en Y ont donné lieu à une publication présentée en annexe (Simonnet *et al.*, 2014).

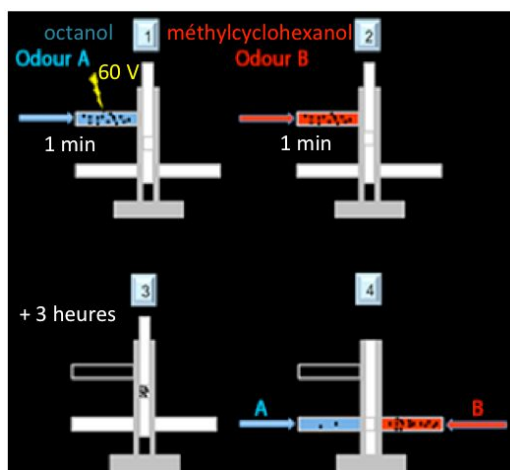
#### **b) Tests en T et évaluation de l'apprentissage et de la mémoire**

Les tests permettant d'évaluer la mémoire olfactive aversive des drosophiles de différents génotypes ont été réalisés par le Dr. Guillaume Isabel à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Ces tests ont été réalisés sur des drosophiles adultes âgées de 2 à 3 jours dans l'obscurité. La première phase de ces expériences est le conditionnement des drosophiles. Lors de cette phase, un groupe de drosophiles est exposé à une odeur A (le stimulus conditionnel) présentée pendant une minute simultanément à 12 chocs électriques (le stimulus inconditionnel) de 60 Volts durant 1,5 secondes et espacés de 5 secondes, puis à une odeur B présentée sans chocs (Figure 32). Les deux odeurs utilisées sont le 3-octanol (Fluka 74878 ; Sigma-Aldrich) et le 4-méthylcyclohexanol (Fluka 66360 ; Sigma-Aldrich) diluées respectivement à 0,360 mM et à 0,325 mM dans de l'huile de paraffine (VWR



international ; Sigma-Aldrich). Le conditionnement réciproque est réalisé sur une deuxième cohorte de drosophiles en inversant les odeurs pour l'association aux chocs électriques. La seconde phase de l'expérience est la phase de test, réalisée 3 heures après la phase de conditionnement. Le groupe de drosophiles conditionnées est placé dans un dispositif en T dans lequel les drosophiles peuvent se déplacer pendant 1 minute soit dans un tube enrichi en l'odeur A précédemment associée aux chocs électriques, soit dans un tube enrichi en l'odeur B.



**Figure 32 : Dispositif en T servant aux tests de mémoire olfactive aversive**

Lors de la phase de conditionnement, un groupe de drosophiles est exposé à une odeur A pendant 1 minute simultanément à une série de 12 chocs électriques de 60 Volts puis à une odeur B sans chocs électriques. Lors de la phase de test (réalisée 3 heures après le conditionnement), les drosophiles peuvent choisir pendant une minute entre un tube enrichi en l'odeur A et un tube enrichi en l'odeur B.

Le nombre de drosophiles dans chaque tube est ensuite compté afin de calculer un indice de performance. Cet indice final correspond à la moyenne des indices obtenus dans les deux expériences réciproques ((nombre d'individus dans le tube contenant l'odeur B (préalablement non associée aux chocs électriques) – nombre d'individus dans le tube contenant l'odeur A (préalablement associée aux chocs électriques)) / nombre total d'individus présents dans le dispositif).

Afin de comparer les indices de performance des différents génotypes, les résultats sont analysés statistiquement par un test t de Student en comparant deux à deux les génotypes « mutants » aux génotypes témoins correspondants.

### c) Ethovision et évaluation de l'activité locomotrice

Les tests d'activité locomotrice ont été réalisés sur des drosophiles adultes âgées de 4 à 9 jours en mesurant leur vitesse de déplacement. Pour ces tests, les drosophiles sont placées individuellement sous un verre de montre de 5 centimètres de diamètre et sont suivies pendant 10 minutes grâce à un logiciel d'Ethovision (EthoVision XT software ;

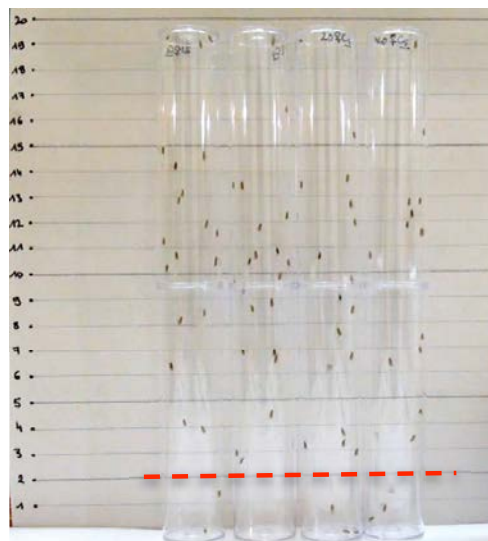
Noldus information technology). Ces mesures sont effectuées dans une pièce à 25°C en lumière rouge.

Afin de comparer les vitesses de déplacement des différents génotypes, les données ont été analysées statistiquement avec une one-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey, après avoir vérifié que les valeurs suivent une loi normale (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

#### d) « Climbing » et évaluation du réflexe de géotaxie négative

Le protocole mis en place par Barone et Bohmann a été suivi afin de réaliser les tests de « climbing » permettant d'évaluer le réflexe de géotaxie négative des drosophiles (Barone et Bohmann, 2013).

Ces tests ont été réalisés pendant 5 semaines consécutives à 25°C en lumière blanche sur des groupes de 20 drosophiles adultes âgées initialement de 1 semaine. Le dispositif de test dans lequel les drosophiles sont placées est composé de deux tubes en plastique joints entre eux par du scotch transparent afin de former une colonne de 19 cm de long pour 2,85 cm de diamètre (Figure 33).



**Figure 33 : Dispositif expérimental permettant de mesurer l'activité de "climbing"**

Un groupe de 20 drosophiles est placé dans une colonne en plastique qui est tapée pendant 10 secondes afin que toutes les drosophiles se retrouvent au fond du tube puis 10 secondes après avoir cessé de taper les tubes, le nombre de drosophiles au dessus de 2 cm (marque rouge) est compté afin de calculer un pourcentage correspondant à l'activité de « climbing ».

L'expérience débute en tapant les colonnes en plastique pendant 10 secondes afin que toutes les drosophiles se retrouvent au fond du tube. Après 50 secondes, les tubes sont à nouveau tapés pendant 10 nouvelles secondes et ainsi de suite jusqu'à atteindre 10 répétitions pour chaque cohorte (5 cohortes de drosophiles femelles et 5 cohortes de

drosophiles mâles indépendantes sont testées par génotype). L'ensemble des expériences est filmé pour permettre l'analyse des résultats.

L'analyse consiste à compter le nombre de drosophiles au dessus de la marque à 2 cm 10 secondes après la frappe des tubes (en rouge sur la Figure 33), à faire la moyenne des 10 répétitions et à exprimer cette moyenne en pourcentage en la rapportant au nombre total de drosophiles de la cohorte. Ce pourcentage (activité de « climbing ») représente le résultat obtenu pour un seul réplicat.

Afin de comparer l'activité de « climbing » des différents génotypes, les données ont été analysées statistiquement avec une two-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (le nombre de réplicats par génotype est identique). Ces tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

# RÉSULTATS



## RÉSULTATS

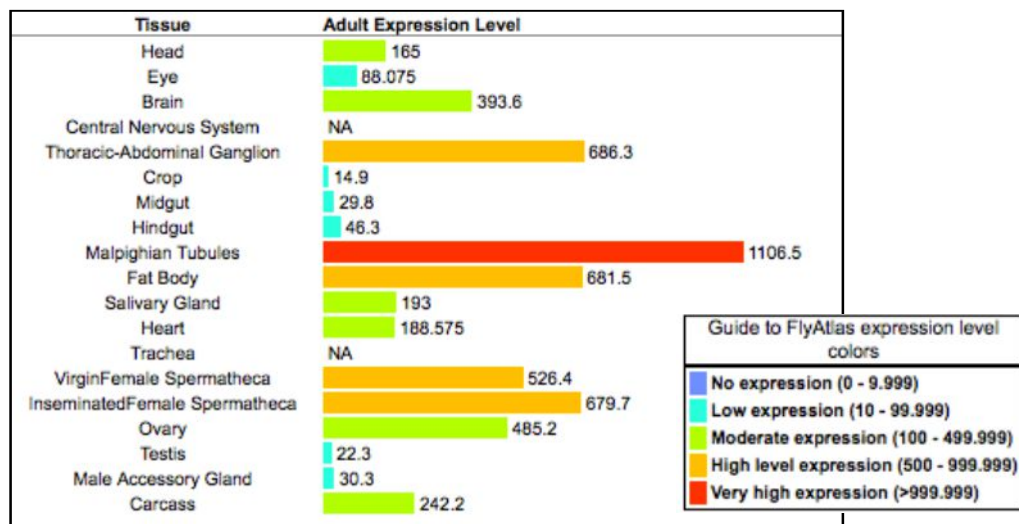
### Partie 1 : Profil d'expression de *minidiscs* dans le cerveau de drosophile adulte

Mnd n'était à ce jour décrit que pour son rôle dans le tissu adipeux chez la larve de drosophile (Martin *et al.*, 2000). Avant de pouvoir étudier le rôle de Mnd dans le système nerveux de la drosophile adulte, il a donc fallu déterminer dans un premier temps si *mnd* est exprimé dans le cerveau, et dans quels types cellulaires.

#### a) Expression de *minidiscs* dans le cerveau de drosophile adulte

##### a.1) Recherche par bioinformatique

Selon les données recueillies sur la base de données bioinformatique « flybase », *mnd* est exprimé chez la drosophile adulte dans l'ensemble du corps à des niveaux variables selon les tissus et organes et notamment au niveau du cerveau à un niveau modéré (Figure 34).

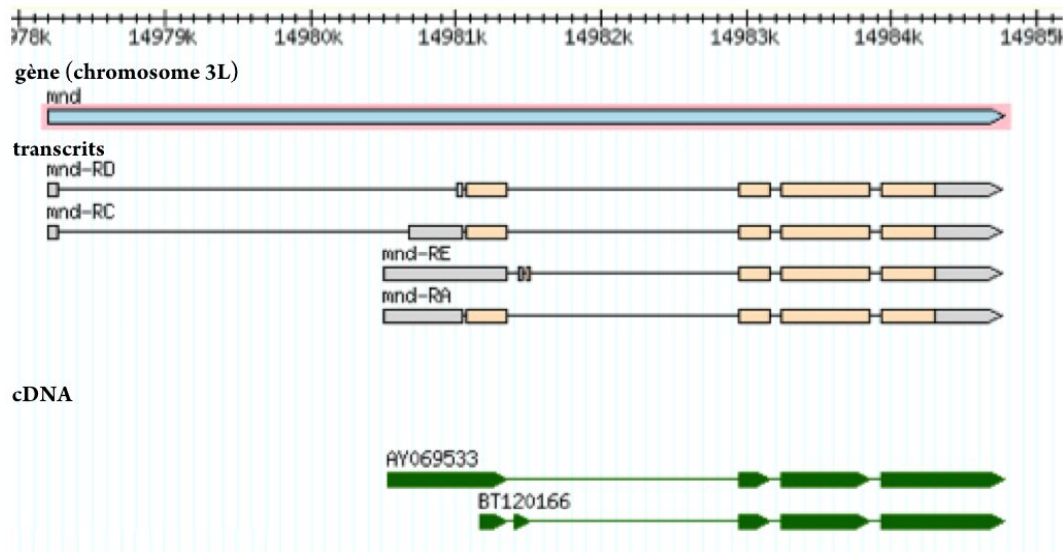


**Figure 34 : Quantité de transcrits de *minidiscs* dans différents tissus et organes chez la drosophile adulte**

Selon les données fournies par FlyAtlas, *mnd* est exprimé dans le cerveau de drosophile adulte à un niveau modéré ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

D'après cette base de données, il existerait quatre transcrits différents de *mnd* qui permettraient la synthèse de deux isoformes de la protéine Mnd (Figure 35). Les transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* permettraient la synthèse de l'une de ces isoformes et *mnd-RE* celle de l'autre isoforme. L'analyse des différents cadres de lecture possibles pour chacun de ces transcrits (<http://web.expasy.org/translate/>) et de la présence d'une séquence de Kozak (Cavener, 1987) indique que le même codon Start est partagé par *mnd-RD*, *RC* et *RA*. Le codon Start de *mnd-RE* est quant à lui différent de celui des trois autres transcrits et se situe dans un autre cadre de lecture.

L'existence de deux isoformes de Mnd est également suspectée par l'identification de deux ADNc de *mnd* (AY069533 et BT120166) qui diffèrent l'un de l'autre par leur côté 5' (Figure 35).



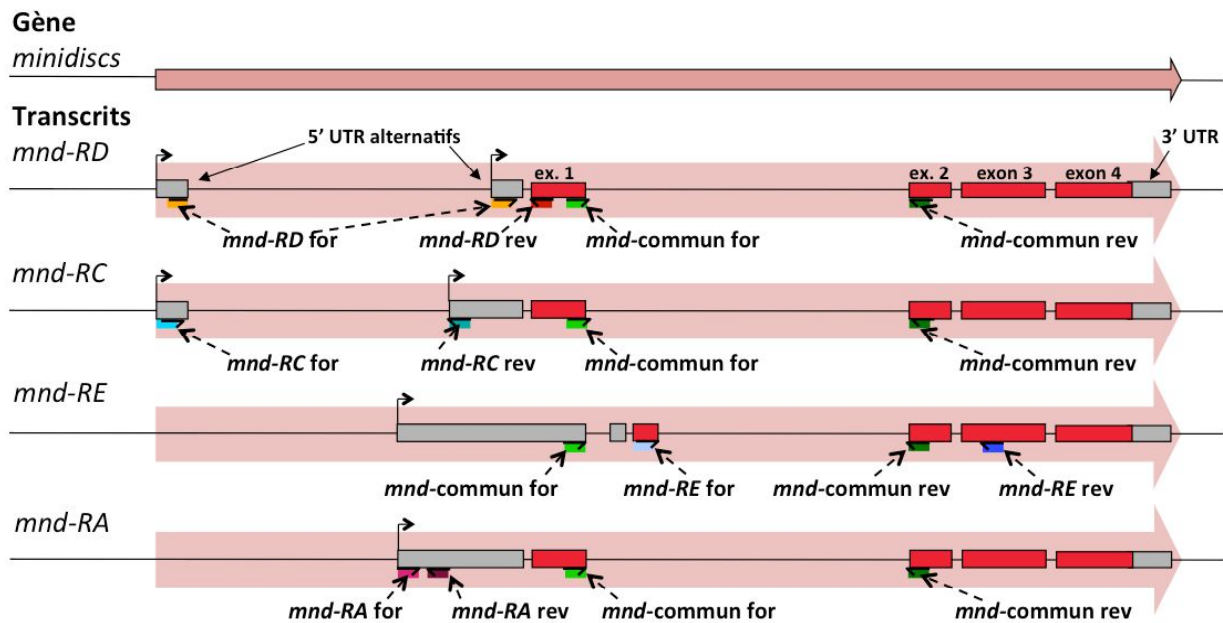
**Figure 35 : Schématisation du locus de *minidisks* sur le chromosome 3L**

Les quatre transcrits de *mnd* sont représentés en gris (parties non traduites) et orange clair (parties traduites) et les deux ADNc associés à *mnd* sont représentés en vert ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

#### *a.2) Approche par biologie moléculaire (RT-PCR)*

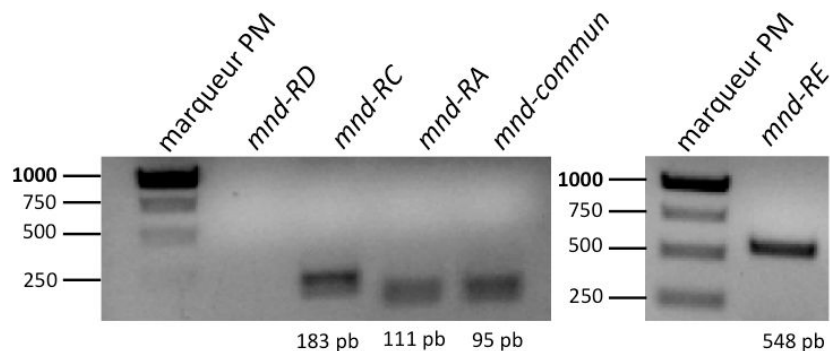
Afin de savoir si les différents transcrits décrits par « flybase » sont bien présents dans le système nerveux central de drosophile, des extractions d'ARN ont été effectuées sur des têtes de drosophiles *w<sup>1118</sup>* âgées de 4 à 9 jours. Après rétro-transcription de ces ARN en ADNc, des PCR ont été réalisées en utilisant des couples d'amorces spécifiques de chacun de ces transcrits et un couple d'amorces commun aux quatre transcrits (*cf.* Partie 3-d du matériel et méthodes, Tableau XXVII) (Figure 36).

Les produits de PCR ont ensuite été visualisés sur gel d'agarose après migration électrophorétique (Figure 37). Malgré les différents ajustements pour les conditions de PCR utilisés et la réalisation de RT-PCR à partir d'ADNc de drosophiles entières, aucune amplification n'a pu être obtenue pour le couple d'amorces spécifique du transcrits *mnd-RD*. L'existence de ce transcrit n'a donc pas pu être confirmée. Les autres couples d'amorces ont quant à eux permis d'obtenir des amplicons dont la taille correspond à celle attendue. Ces résultats indiquent que les transcrits *mnd-RC*, *RA* et *RE* sont bien exprimés dans les têtes de drosophiles adultes.



**Figure 36 : Représentation schématique de l'emplacement des amorces utilisées en RT-PCR pour amplifier spécifiquement les différents transcrits de *minidiscs***

Les amorces permettent d'amplifier 114 pb pour *mnd-RD*, 183 pb pour *mnd-RC*, 111 pb pour *mnd-RA*, 548 pb pour *mnd-RE* et 95 pb pour les amorces communes aux quatre transcrits.



**Figure 37 : Mise en évidence de l'expression des transcrits *mnd-RC*, *RA* et *RE* dans les têtes de drosophiles adultes**

Séparation électrophorétique des produits de RT-PCR obtenus à partir d'ADNc de têtes de drosophiles *w<sup>1118</sup>*. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour chacun des transcrits de *mnd* mise à part pour *mnd-RD* (aucune amplification) ; PM : Poids Moléculaire.

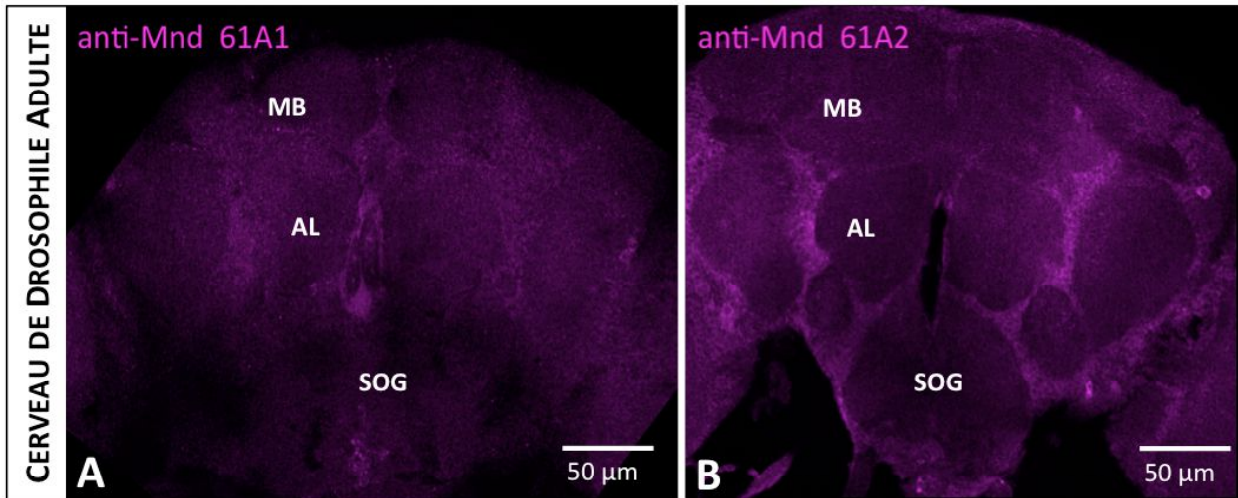
### b) Étude du profil d'expression cellulaire de *minidiscs*

Afin de déterminer dans quels types cellulaires *mnd* est exprimé dans le cerveau de drosophile adulte, des anticorps anti-Mnd ont été produits chez deux lapins (lot 61A1 et 61A2 ; cf. Partie 4-a du matériel et méthodes, Figure 30).

Les marquages réalisés sur des cerveaux de drosophiles *w<sup>1118</sup>* indiquent que l'anticorps anti-Mnd 61A2 (Figure 38B) permet d'obtenir un signal plus intense que l'anticorps anti-Mnd 61A1 (Figure 38A) par rapport au bruit de fond à dilution équivalente. L'anticorps anti-Mnd 61A2 a donc été utilisé pour la suite des expériences d'immunohistologie. Par



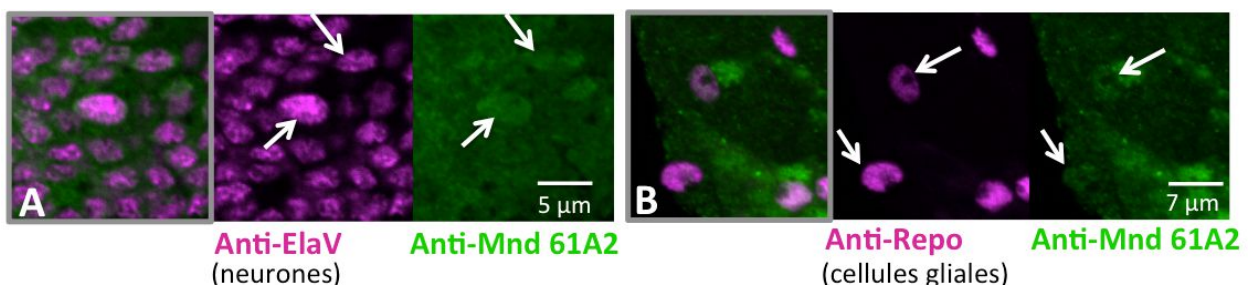
ailleurs, le marquage obtenu avec cet anticorps semble indiquer que *mnd* est largement exprimé dans le cerveau de drosophile adulte.



**Figure 38 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps 61A1 et 61A2 sur cerveau de drosophile adulte**

Marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles *w<sup>1118</sup>* adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A1 (A) ou 61A2 (B) (magenta); MB : Corps Pédonculés ; AL : Lobes Antennaires ; SOG : Ganglion sous-œsophagien.

Pour savoir si *mnd* est exprimé dans les neurones ou dans les cellules gliales, qui sont les deux grands types cellulaires présents dans le cerveau, des doubles marquages avec des anticorps anti-Mnd 61A2 et des anticorps anti-ElaV (Figure 39A) ou anti-Repo (Figure 39B) ont été réalisés. ElaV (protéine de liaison à l'ARN) et Repo (facteur de transcription) sont des protéines nucléaires qui sont respectivement des marqueurs des neurones et des cellules gliales (Robinow et White, 1988; Xiong *et al.*, 1994). Ces doubles marquages permettent d'observer une superposition du signal Mnd et ElaV (Figure 39A) mais également du signal Mnd et Repo (Figure 39B). Ces résultats suggèrent que *mnd* est exprimé dans certains neurones et dans certaines cellules gliales.



**Figure 39 : Profil d'expression de *mnd* dans les neurones et dans les cellules gliales**

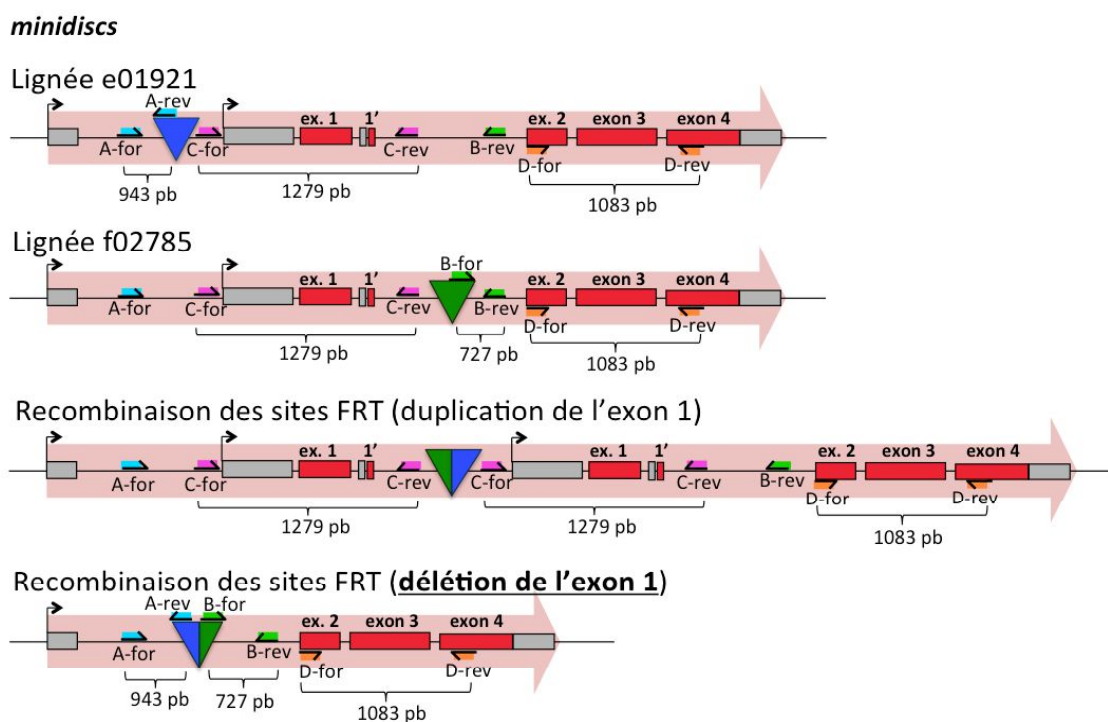
Doubles marquages réalisés sur coupes de têtes de drosophiles *w<sup>1118</sup>* adultes avec des anticorps anti-ElaV (magenta) permettant de marquer les neurones (A) ou anti-Repo (magenta) permettant de marquer les cellules gliales (B) et des anticorps anti-Mnd 61A2 (vert) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal).

## c) Étude de la spécificité de l'anticorps anti-Minidiscs en immunohistologie

## c.1) Procédure mise en place pour tenter de créer une lignée KO pour minidiscs

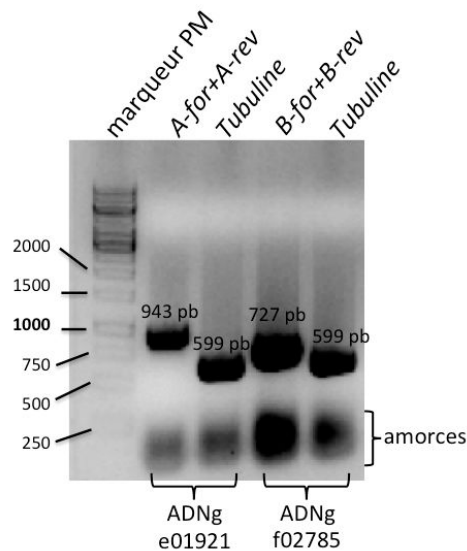
La meilleure façon d'évaluer la spécificité d'un anticorps est de le tester sur une lignée ne produisant pas la protéine contre laquelle il est dirigé. Afin de créer une lignée KO pour *mnd*, différentes lignées ont été commandées (cf. Partie 1-i du matériel et méthodes, Figure 24 et Tableau XXIII).

Avant de commencer les croisements nécessaires à l'obtention de la délétion de *mnd*, la présence du transposon portant un site FRT dans le génome des lignées *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>* a été vérifiée par PCR. Après extraction d'ADNg à partir d'individus de chacune de ces lignées, des PCR ont été réalisées en utilisant des couples d'amorces s'hybridant sur *mnd* et sur le transposon (cf. Partie 3-d du matériel et méthodes, Tableau XXVI) (couple d'amorces A et B, Figure 40). Les produits de PCR ont ensuite été visualisés sur gel d'agarose après migration électrophorétique (Figure 48). Les couples d'amorces A et B ont bien permis d'obtenir des amplicons de la taille attendue, ce qui indique que les transposons sont bien présents dans le génome des lignées *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>* et que leur emplacement dans le génome est correct.



**Figure 40 : Représentation schématique de l'emplacement des amorces utilisées en PCR pour vérifier la délétion de *minidiscs***

Le couple d'amorces A permet de vérifier la présence du transposon portant un site FRT dans le génome de la lignée *mnd<sup>e01921</sup>*, le couple d'amorces B permet de vérifier la présence du transposon dans le génome de la lignée *mnd<sup>f02785</sup>*, le couple d'amorces C permet de suivre la présence de l'exon 1 de *mnd* et le couple d'amorces D sert de contrôle positif d'amplification.

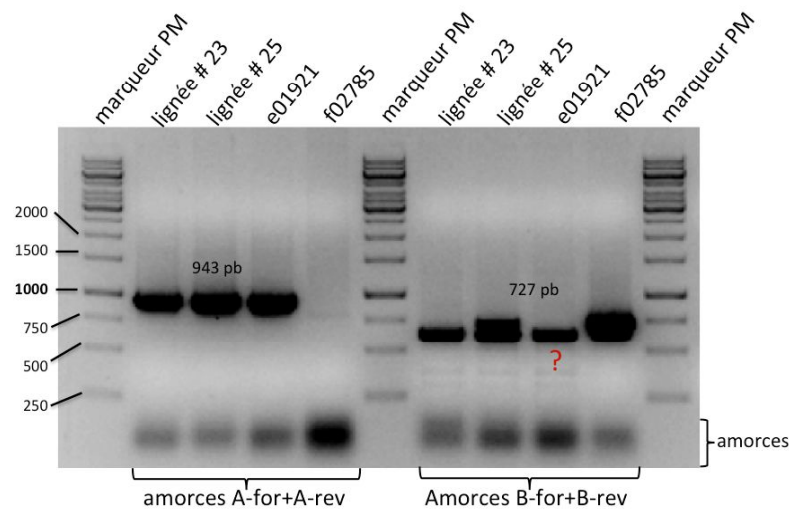


**Figure 41 : Vérification de la présence et de la position des transposons porteurs d'un site FRT dans le génome des lignées *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>***

Séparation électrophorétique des produits de PCR obtenus à partir d'ADNg de drosophiles *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>*. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour chacun des couples d'amorces utilisés. Un couple d'amorces permettant d'amplifier la *Tubuline* a été utilisé pour le contrôle positif d'amplification; PM : Poids Moléculaire.

Une fois ces lignées validées, la procédure permettant la recombinaison entre les sites FRT e01921 et f02785 a été mise en place. Cette recombinaison devrait entraîner soit la duplication du premier exon de *mnd*, soit sa délétion (Figure 40). Cette délétion inclut l'ATG Start des transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* et l'ATG Start du transcrit *mnd-RE*. Si cette délétion a lieu, la protéine Mnd ne devrait donc plus être synthétisée.

Au terme de cette procédure, une trentaine de candidats ont été testés par PCR. Seules les drosophiles délétées pour *mnd* et ayant donc intégré les deux transposons devraient permettre l'obtention d'un amplicon à la fois avec le couple d'amorces A et le couple d'amorces B. Des extractions d'ADNg ont donc été effectuées sur ces différentes lignées pour réaliser ces PCR test. Sur l'ensemble des lignées candidates de départ, seuls les résultats obtenus pour les lignées #23 et #25 sont présentés, les autres lignées ayant rapidement été écartées (Figure 42). Un amplicon de taille attendue est obtenu avec les couples d'amorces A et B pour les lignées #23 et #25, ce qui en fait de bons candidats pour la délétion de *mnd*. Cependant, un amplicon a également été obtenu avec le couple d'amorces B pour la lignée *mnd<sup>e01921</sup>* ce qui ne devrait pas être le cas. La réalisation de PCR avec un nouveau couple d'amorces similaire au couple d'amorces B n'a pas changé ce résultat qui pourrait alors s'expliquer par la présence de plusieurs transposons dans le génome de la lignée *mnd<sup>e01921</sup>*. En effet, des problèmes d'insertions multiples ont déjà pu être constatés pour d'autres types de lignées transgéniques (Green *et al.*, 2014).



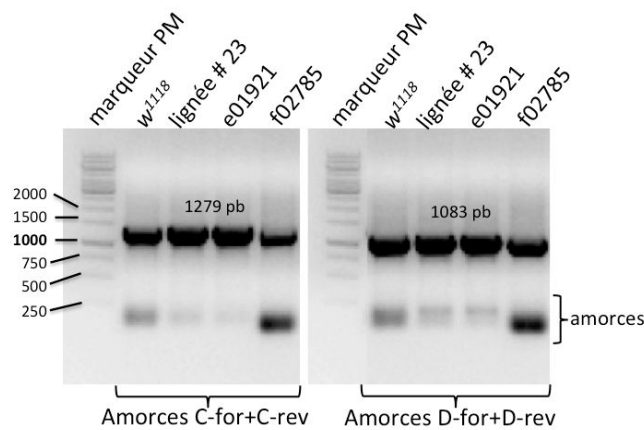
**Figure 42 : Vérification de la présence des deux transposons e01921 et f02785 dans le génome des lignées #23 et #25 candidates pour la délétion de *mnd***

Séparation électrophorétique des produits de PCR obtenus à partir d'ADNg de drosophiles #23, #25, *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>*. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour les lignées #23 et #25 avec les couples d'amorces A et B. Par contre, une amplification est aussi obtenue pour la lignée *mnd<sup>e01921</sup>* avec le couple d'amorces B, ce qui ne devrait pas être le cas; PM : Poids Moléculaire.

Afin de savoir si les lignées #23 et #25 présentent une délétion de *mnd* ou si elles ont simplement intégré plusieurs transposons, d'autres PCR test ont été réalisées avec le couple d'amorces C (présence ou non de l'exon 1) et le couple d'amorces D (contrôle positif d'amplification) (Figure 40).

Contrairement aux PCR précédentes, ces PCR nécessitent impérativement de travailler avec de l'ADNg de drosophiles homozygotes. Cependant, la lignée #23 ne dépasse pas le stade pupal et la lignée #25 le stade larvaire à l'état homozygote. Ces lignées sont donc maintenues avec le balancer TM6b. Cette observation pourrait correspondre à ce qui a été observé par Martin et collaborateurs lors de l'élaboration de plusieurs mutants pour *mnd* par mutagenèse chimique. Parmi l'ensemble des mutants créés, seuls quelques uns atteignaient le stade adulte. La mortalité était majoritairement observée au stade pupal tandis que quelques mutants ne dépassaient pas le 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> stade larvaire (Martin *et al.*, 2000).

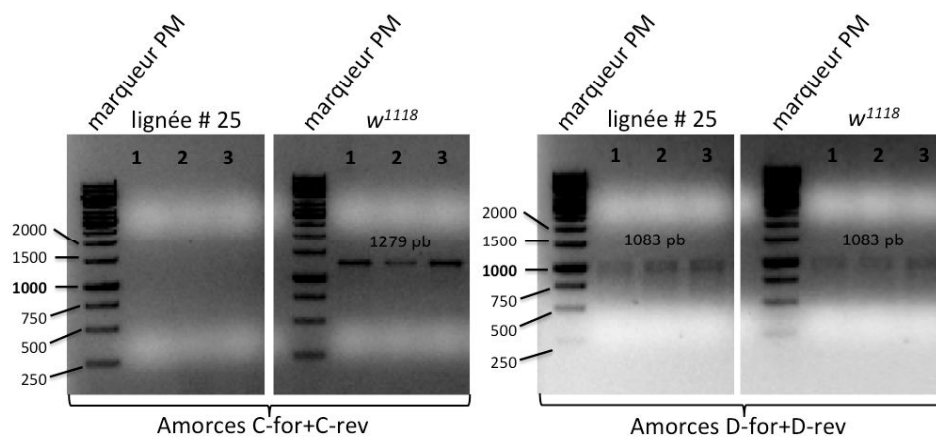
Pour tester la lignée #23, une extraction d'ADNg a donc été réalisée sur des pupes homozygotes (non TM6b). Les produits de PCR obtenus à partir de cet ADNg ont ensuite été visualisés sur gel d'agarose après migration électrophorétique (Figure 43). Les couples d'amorces C et D ont permis d'obtenir des amplicons de la taille attendue pour la lignée #23 et les différents témoins, ce qui indique que la lignée #23 ne présente pas de délétion de *mnd*.



**Figure 43 : Vérification de la présence de l'exon 1 de *mnd* dans le génome de la lignée #23 candidate pour la délétion de *mnd***

Séparation électrophorétique des produits de PCR obtenus à partir d'ADNg de pupes *w<sup>1118</sup>*, #23, *mnd<sup>e01921</sup>* et *mnd<sup>f02785</sup>*. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour toutes les lignées avec les couples d'amorces C (présence de l'exon 1 de *mnd*) et D (contrôle positif d'amplification) ; PM : Poids Moléculaire.

Pour la lignée #25, le balancer TM6b a été remplacé par le balancer TM3GFP afin de pouvoir sélectionner des larves homozygotes (non fluorescentes). Compte tenu de la faible proportion de larves homozygotes, les extractions d'ADNg ont été réalisées à partir d'une seule larve. Trois larves #25 et trois larves *w<sup>1118</sup>* ont ainsi été utilisées pour faire les PCR test (Figure 44). L'absence d'amplification avec le couple d'amorces C pour les trois larves de la lignée #25 semble indiquer que l'exon 1 de *mnd* a bien été délété pour cette lignée.

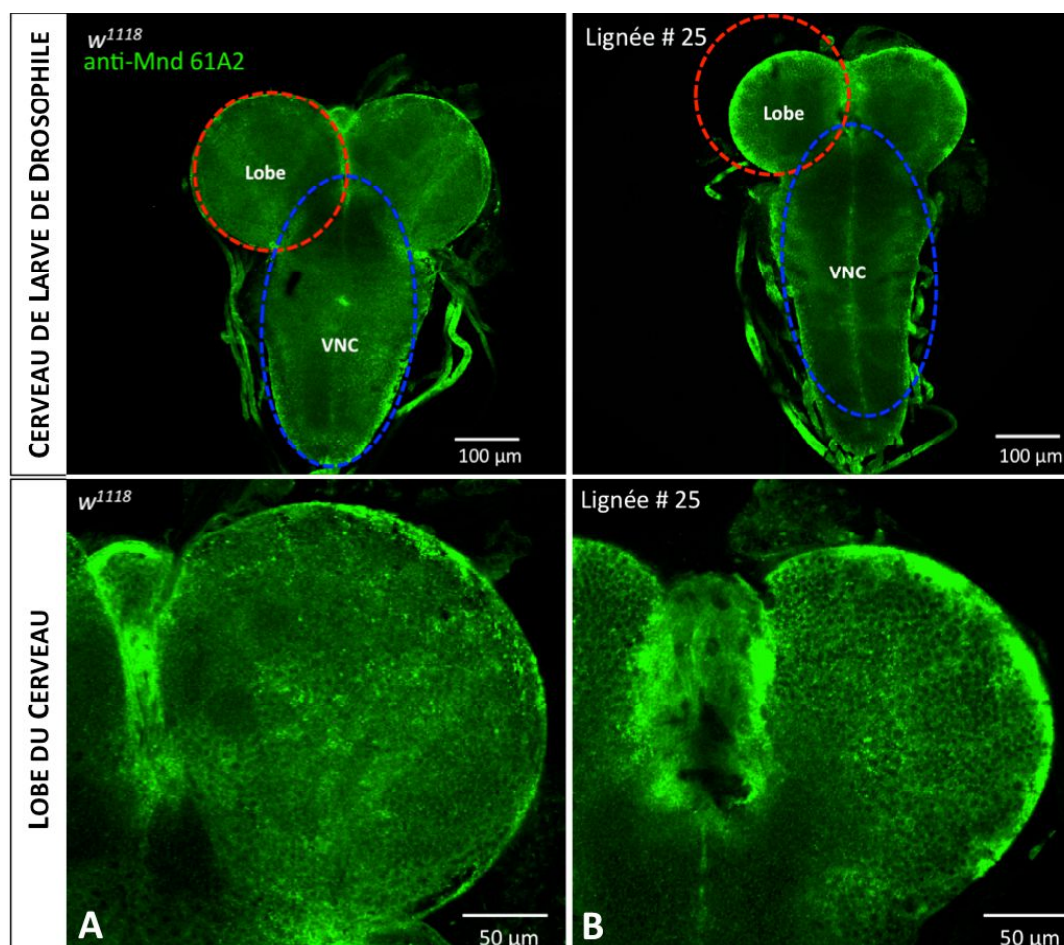


**Figure 44 : Vérification de la présence de l'exon 1 de *mnd* dans le génome de la lignée #25 candidate pour la délétion de *mnd***

Séparation électrophorétique des produits de PCR obtenus à partir d'ADNg de larves *w<sup>1118</sup>* et #25. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour les 3 larves de la lignée #25 avec le couple d'amorces D (contrôle positif d'amplification) mais pas avec le couple d'amorces C (présence de l'exon 1 de *mnd*). Une amplification de la taille attendue est obtenue pour les 3 larves de la lignée *w<sup>1118</sup>* avec les couples d'amorces C et D; PM : Poids Moléculaire.

Cette lignée a été utilisée pour tester les anticorps anti-Mnd 61A2 en réalisant des marquages sur des cerveaux de larves L3 *w<sup>1118</sup>* (Figure 45A) et #25 (Figure 45B). La

période de ponte (pendant 2 heures sur pondoirs) a été synchronisée entre ces deux lignées afin que les larves utilisées pour les dissections soient au même stade de développement.



**Figure 45 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de larves témoins ou potentiellement délétées pour *mnd***

Marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de larves L3 *w<sup>1118</sup>* (A) et #25 (B) avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (vert). Le cercle rouge et l'ovale bleu reportés sur les cerveaux de drosophiles *w<sup>1118</sup>* et #25 sont de même dimension entre les deux images; VNC : Chaîne Nerveuse Ventrale.

Morphologiquement, les lobes du cerveau des larves de la lignée #25 apparaissent plus petits que ceux des larves *w<sup>1118</sup>* alors que la taille de leur chaîne nerveuse ventrale semble être similaire (compte tenu du peu de larves #25 homozygotes récoltées, aucune quantification n'a été réalisée). Cette observation pourrait également correspondre à ce qui avait été observé par Martin et collaborateurs. En effet, les mutants pour *mnd* créés par mutagenèse chimique présentent une diminution de plus de 50% de la taille de leurs lobes ainsi qu'une diminution de 10 à 20% de la taille de leur chaîne nerveuse ventrale par rapport aux drosophiles sauvages (Martin *et al.*, 2000).

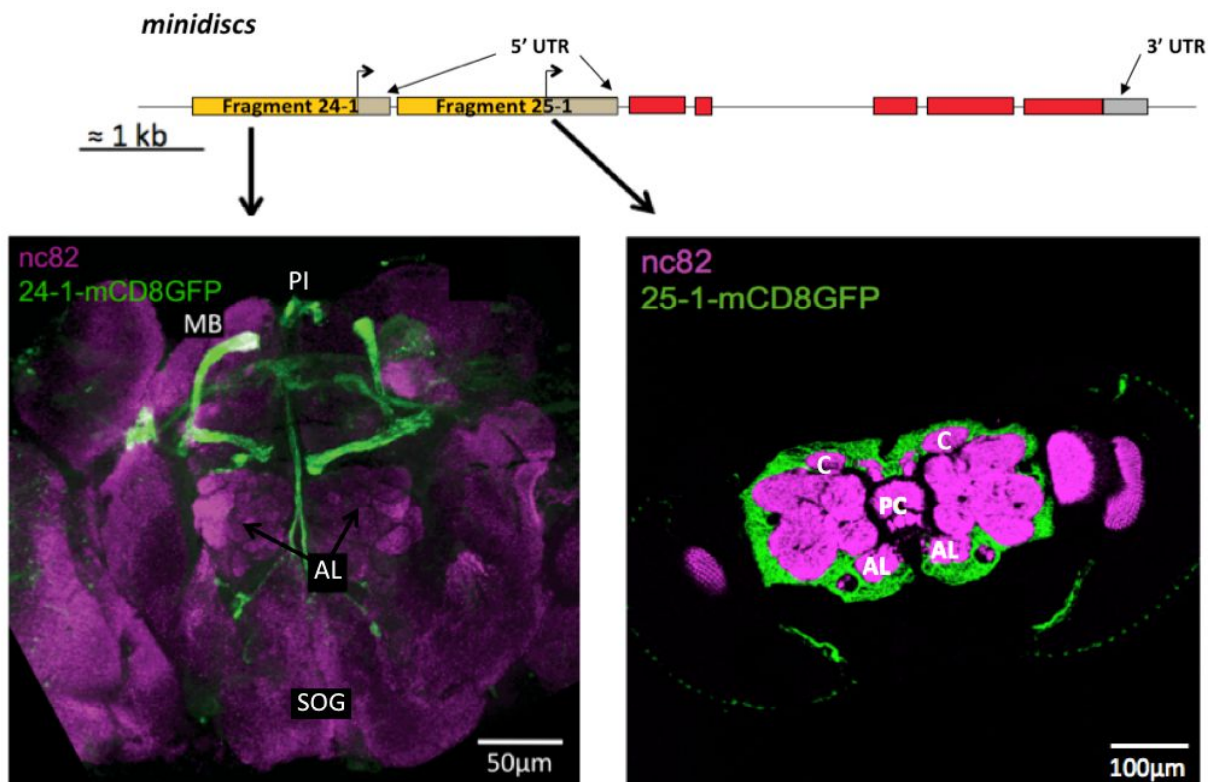
Cependant, même si cette constatation semble confirmer que la délétion de *mnd* a bien eu lieu pour la lignée #25, aucune différence de marquage ne peut être observée entre

*w<sup>1118</sup>* et #25. Ce résultat indique soit que la délétion de *mnd* n'a pas eu lieu, soit que l'anticorps anti-Mnd 61A2 n'est pas spécifique de la protéine Mnd.

D'autres approches ont donc été mises en place pour tester la spécificité de cet anticorps.

### c.2) Création de lignées permettant de déréguler l'expression de *mnd*

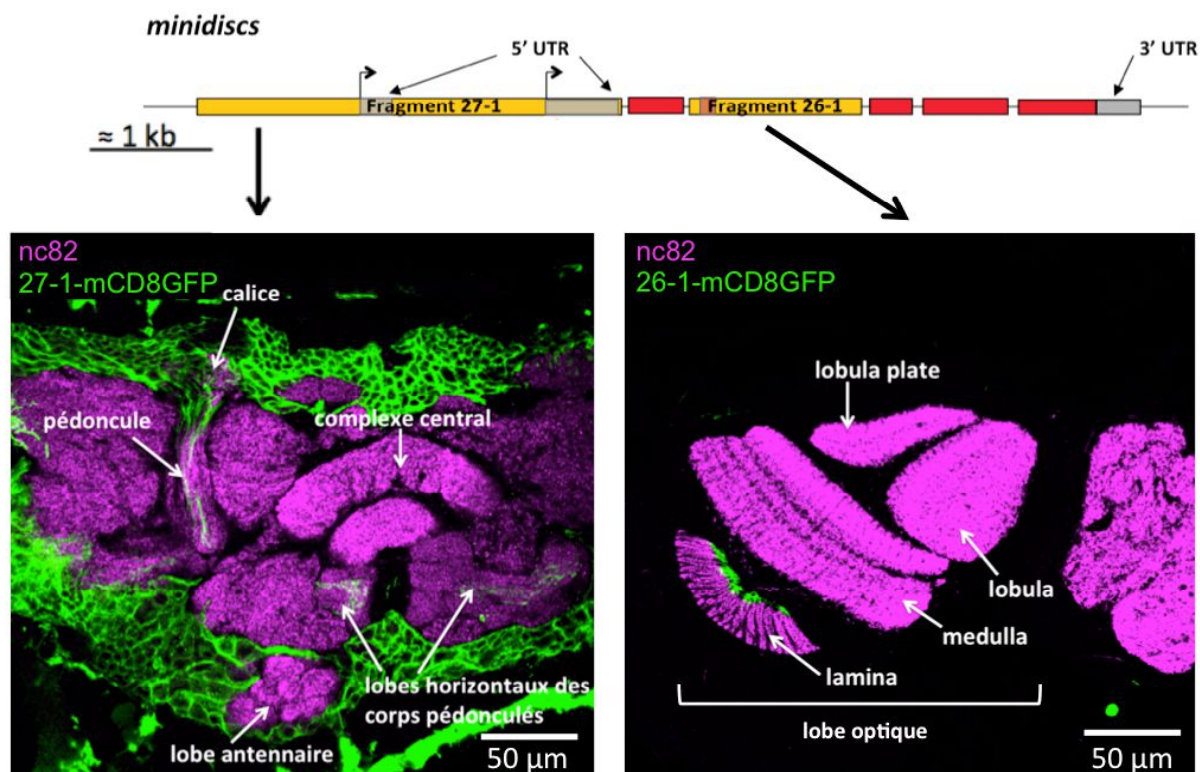
Quatre lignées Gal4 ont été générées afin de créer des outils génétiques permettant de déréguler l'expression de *mnd* mais aussi d'étudier le profil d'expression de différentes séquences potentiellement régulatrices de l'expression de *mnd* (cf. Partie 1-e.1 du matériel et méthodes, Figure 17). Des expériences d'immunohistochimie ont permis d'observer les profils d'expression de ces séquences dans le cerveau de drosophile adulte. La séquence 24-1 conduit à l'expression de la GFP dans les neurones des corps pédonculés (MB) et de la Pars Intercerebralis (PI) et la séquence 25-1 à l'expression de la GFP dans les cellules gliales du cortex (Figure 46). Ce sont ces deux lignées Gal4 qui seront principalement utilisées par la suite.



**Figure 46 : Visualisation du profil d'expression des séquences régulatrices 24-1 et 25-1 dans le cerveau de drosophile adulte**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes et sur coupes de têtes de drosophiles 25-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-nc82 (magenta) permettant de marquer les neuropiles et des anticorps anti-GFP (vert) (réalisés par Anna Ziegler); MB: Corps Pédonculés; PI: Pars Intercerebralis; AL: Lobes Antennaires; SOG: Ganglion sous-œsophagien; C: Calices; PC: Protocérébron; kb: kilo bases; UTR: Région non traduite.

La séquence 26-1 conduit quant à elle à l'expression de la GFP dans les cellules gliales marginales du système visuel et la séquence 27-1 à l'expression de la GFP dans les neurones des corps pédonculés (MB) ainsi que dans les cellules gliales du cortex (Figure 47).



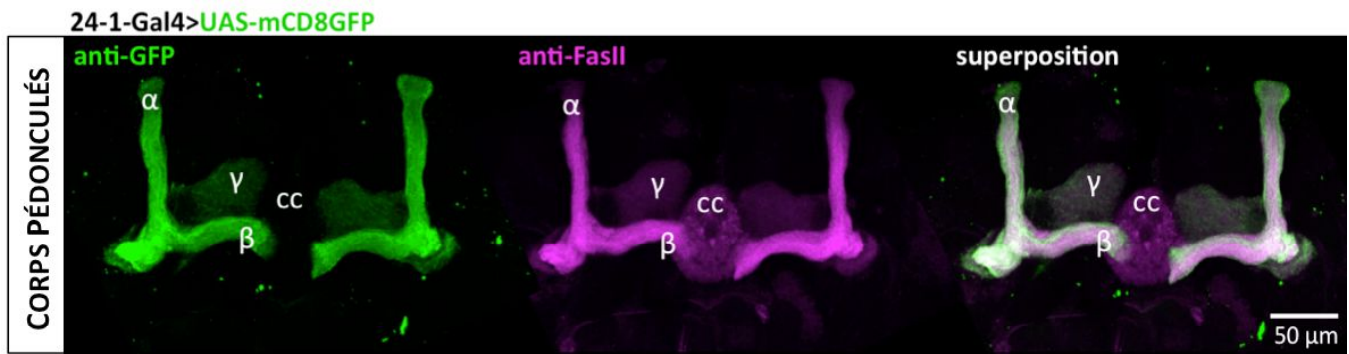
**Figure 47 : Visualisation du profil d'expression des séquences régulatrices 26-1 et 27-1 dans le cerveau de drosophile adulte**

Doubles marquages réalisés sur coupes de têtes de drosophiles 26-1-Gal4>UAS-mCD8GFP et 27-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-nc82 (magenta) permettant de marquer les neuropiles et des anticorps anti-GFP (vert) (réalisés par Anna Ziegler). kb : kilo bases ; UTR : Région non traduite.

Afin de préciser le profil d'expression de la séquence 24-1 dans les corps pédonculés, d'autres doubles marquages ont été réalisés en utilisant un anticorps anti-FasciclinII (FasII) permettant de marquer les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (Lin *et al.*, 2009). La Fasciclin est une glycoprotéine présente à la membrane cellulaire qui est impliquée dans le guidage axonique au cours du développement (Whitlock, 1993).

La superposition complète des marquages avec les anticorps anti-FasII et anti-GFP montre que la séquence 24-1 conduit à l'expression de la GFP dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés mais pas dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  (Figure 48).

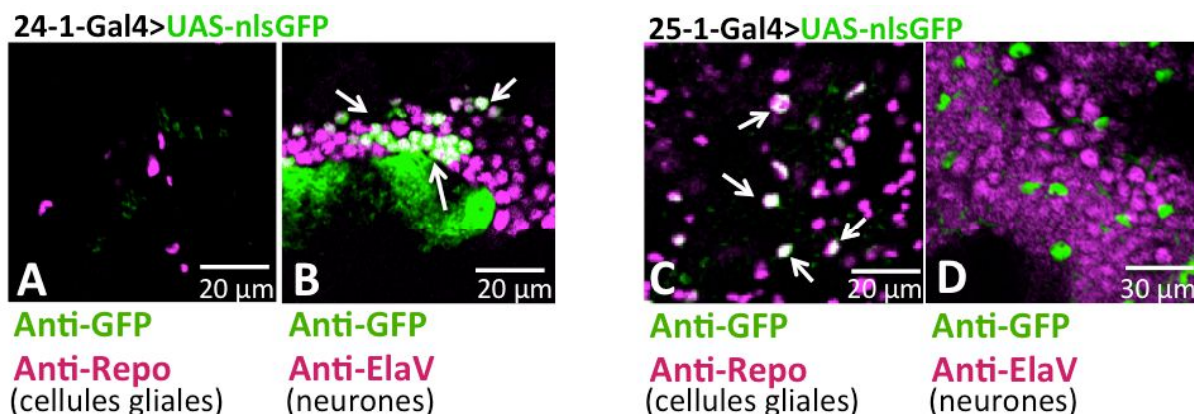




**Figure 48 : Visualisation du profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-FasII (magenta) permettant de marquer les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et des anticorps anti-GFP (vert); cc : complexe central.

Des doubles marquages réalisés avec des anticorps anti-ElaV (marqueur des neurones ; Figure 49 B et D) ou des anticorps anti-Repo (marqueur des cellules gliales ; Figure 49 A et C) ont permis de confirmer le type cellulaire exprimant la GFP pour chacune de ces séquences régulatrices. Pour les drosophiles 24-1-Gal4>UAS-nlsGFP, le signal GFP et Repo n'est pas co-localisé (Figure 49A) alors que le signal GFP et ElaV semble se superposer (Figure 49B) ce qui indiquerait que la séquence 24-1 conduit à un profil d'expression essentiellement neuronal. À l'inverse, pour les drosophiles 25-1-Gal4>UAS-nlsGFP, le signal GFP et Repo semble se superposer (Figure 49C) alors que le signal GFP et ElaV n'est pas co-localisé (Figure 49D) ce qui indiquerait que la séquence 25-1 mène à un profil d'expression spécifique des cellules gliales.

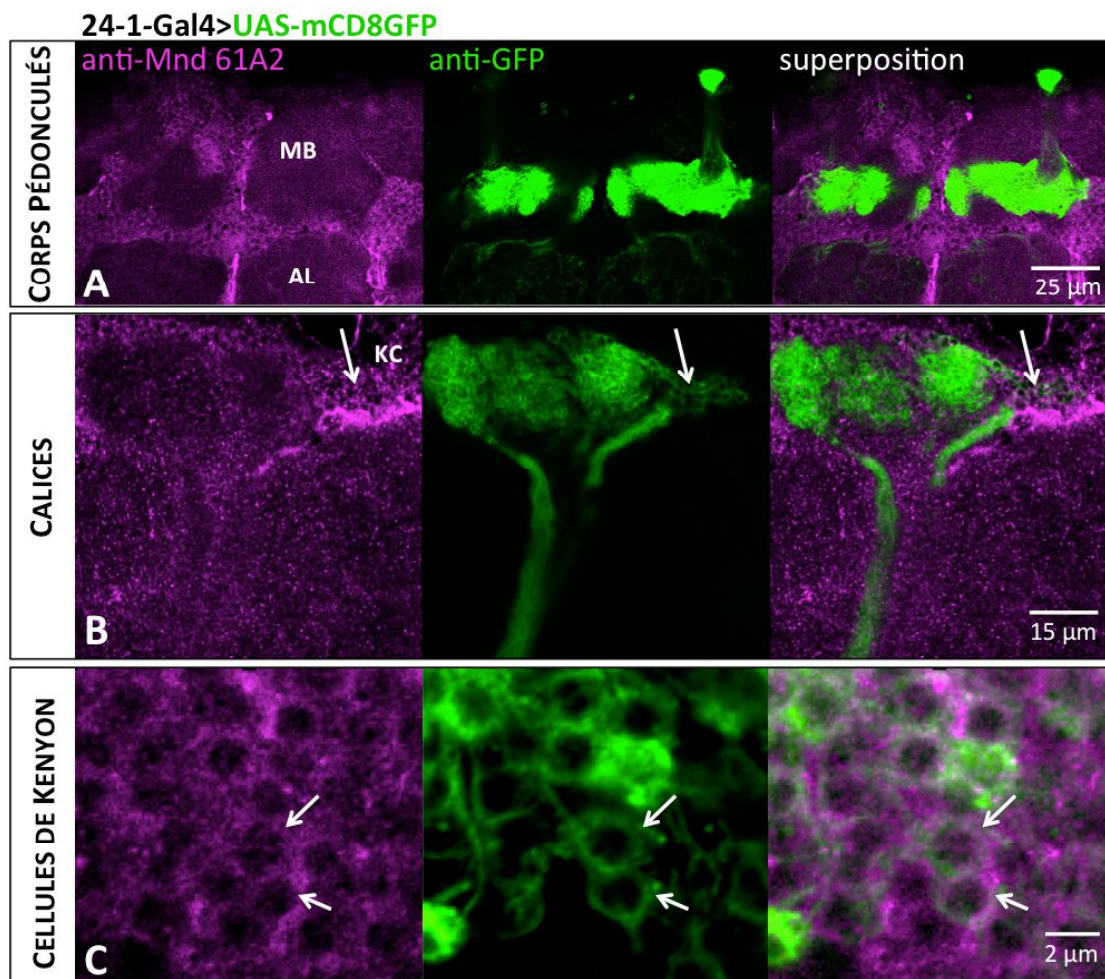


**Figure 49 : Profil d'expression des séquences régulatrices 24-1 et 25-1 dans les neurones et dans les cellules gliales**

Doubles marquages réalisés sur coupes de têtes de drosophiles adultes 24-1-Gal4>UAS-nlsGFP et 25-1-Gal4>UAS-nlsGFP avec des anticorps anti-Repo (A et C) (magenta) permettant de marquer les cellules gliales ou anti-ElaV (B et D) (magenta) permettant de marquer les neurones et des anticorps anti-GFP (vert) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal ; réalisés par Anna Ziegler).

Le profil d'expression des séquences régulatrices 24-1 et 25-1 a ensuite été comparé au marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd 61A2. Si les séquences 24-1 et 25-1 sont bien des séquences régulatrices de l'expression de *mnd* (et que l'anticorps anti-Mnd 61A2 est bien spécifique), alors les marquages obtenus avec des anticorps anti-GFP et anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de drosophiles exprimant la GFP sous la dépendance de la séquence 24-1 ou 25-1 devraient se superposer.

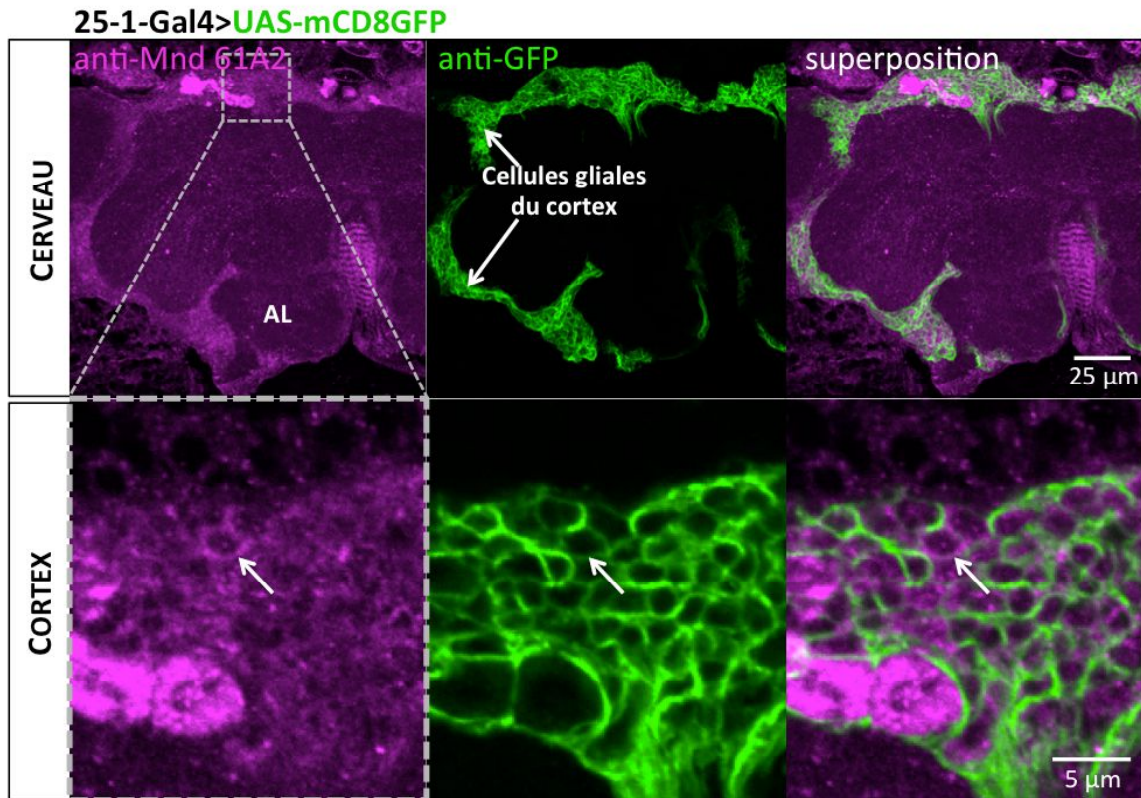
Les doubles marquages réalisés sur des coupes de têtes de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP permettent bien d'observer une superposition du signal au niveau des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés (cellules de Kenyon ; Figure 50 B et C) mais pas au niveau des calices et des axones (lobes des corps pédonculés) (Figure 50 A et B). Ces résultats montrent que Mnd est localisé au niveau du soma des cellules de Kenyon et non au niveau des axones.



**Figure 50 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* (A et C) et coupes de têtes (B) de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau des lobes des corps pédonculés (A), des calices (B) et des cellules de Kenyon (C) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal); MB : Corps Pédonculés ; AL : Lobes Antennaires ; KC : Cellules de Kenyon.

Les doubles marquages réalisés sur des coupes de têtes de drosophiles 25-1-Gal4>UAS-mCD8GFP permettent également d'observer une superposition du signal au niveau des cellules gliales du cortex (Figure 51).



**Figure 51 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 25-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**

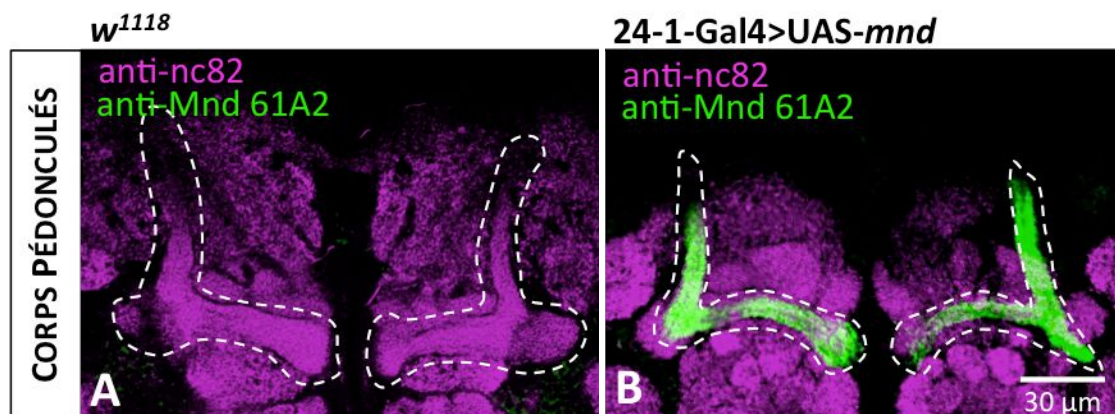
Doubles marquages réalisés sur coupes de têtes de drosophiles 25-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal); AL : Lobes Antennaires.

Cette correspondance entre les marquages semble confirmer que le profil d'expression des séquences 24-1 et 25-1 est représentatif de l'expression de *mnd*. Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2, de nouveaux marquages ont été effectués sur des drosophiles sur-exprimant et sous-exprimant *mnd* dans les corps pédonculés en utilisant la séquence 24-1. Si cet anticorps est spécifique, le signal Mnd devrait varier en fonction du niveau d'expression de *mnd*.

### *c.3) Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd par sur-expression de mnd*

Pour tester la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des drosophiles sur-exprimant *mnd*, une lignée UAS-*mnd* a été créée (cf. Partie 1-h du matériel et méthodes) et a été croisée avec la lignée 24-1-Gal4 afin que *mnd* soit sur-exprimé dans les corps

pédonculés. Les marquages réalisés avec l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur les cerveaux de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-*mnd* permettent d'observer un signal Mnd intense dans les lobes des corps pédonculés (Figure 52B) qui est absent chez les drosophiles *w<sup>1118</sup>* (Figure 52A). Ce résultat montre que l'anticorps anti-Mnd 61A2 reconnaît bien la protéine Mnd. Par ailleurs, la sur-expression de *mnd* entraîne une répartition de Mnd sur l'ensemble de la membrane des neurones des corps pédonculés (axones compris) alors que chez les drosophiles témoins, Mnd est uniquement localisé au niveau du soma des cellules de Kenyon (Figure 50).

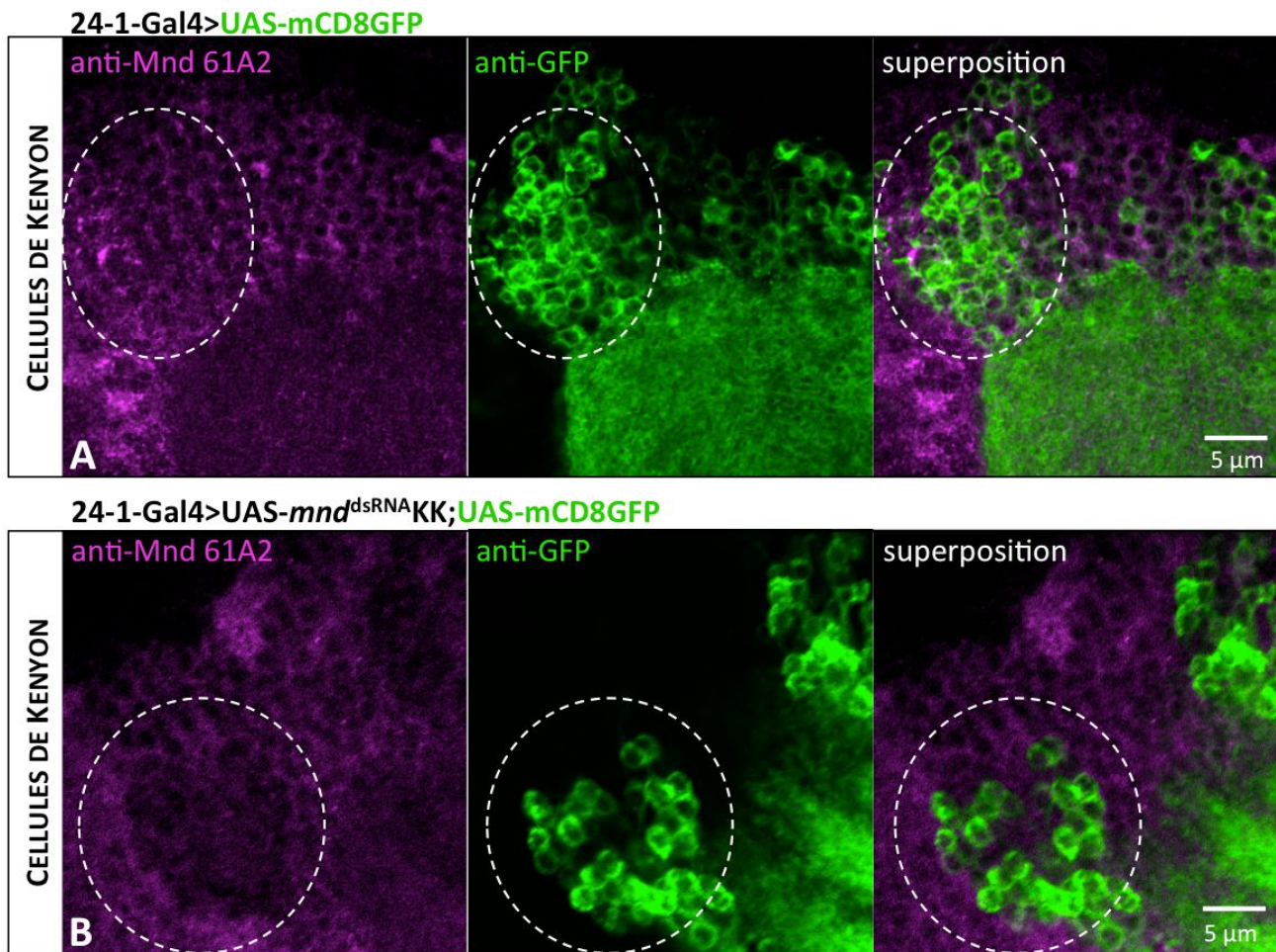


**Figure 52 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de drosophiles témoins ou sur-exprimant *mnd* dans les corps pédonculés**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles adultes *w<sup>1118</sup>* (A) et 24-1-Gal4>UAS-*mnd* (B) avec des anticorps anti-nc82 (magenta) permettant de marquer les neuropiles et des anticorps anti-Mnd 61A2 (vert).

#### *c.4) Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd par sous-expression de *mnd**

Pour confirmer la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2, des marquages ont également été réalisés sur des cerveaux de drosophiles sous-exprimant *mnd* au niveau des corps pédonculés. Pour ces marquages, des drosophiles homozygotes 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP ont été croisées avec des drosophiles UAS-*mnd<sup>dsRNA</sup>KK*. Les drosophiles issues de ce croisement expriment la GFP dans les cellules où les ARNm de *mnd* sont dégradés par des ARN interférents. Une diminution du signal de l'anticorps anti-Mnd 61A2 peut ainsi être observée pour les cellules de Kenyon sous-exprimant *mnd* (marquées par la GFP et encerclées) en comparaison aux cellules exprimant *mnd* à un niveau basal (non marquées par la GFP) (Figure 53B).

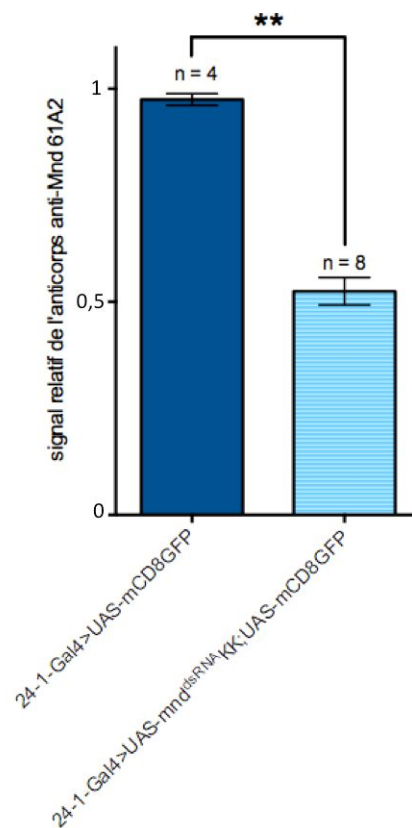


**Figure 53 : Test de la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 sur des cerveaux de drosophiles témoins ou sous-exprimant *mnd* dans les corps pédonculés**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles adultes 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP (A) et 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNAKK</sup>;UAS-mCD8GFP (B) avec des anticorps anti-GFP (vert) et des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta).

La quantification du signal Mnd dans les cellules de Kenyon indique que cette diminution du marquage est de l'ordre de 50% pour les cellules sous-exprimant *mnd* (Figure 54). Pour les drosophiles témoins 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP exprimant *mnd* à un niveau basal dans toutes les cellules, aucune différence de signal Mnd ne peut être observée au niveau des cellules de Kenyon entre cellules marquées ou non par la GFP (Figure 53A et Figure 54). Ce résultat indique que l'anticorps anti-Mnd 61A2 semble bien être spécifique de la protéine Mnd.

La spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 ayant été vérifiée, celui-ci a été utilisé pour affiner l'étude du profil d'expression cellulaire de *mnd* dans le cerveau de drosophile.



**Figure 54 : Diminution du signal relatif de l'anticorps anti-Mnd 61A2 dans les cellules de Kenyon pour les drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les corps pédonculés par rapport aux drosophiles témoins**

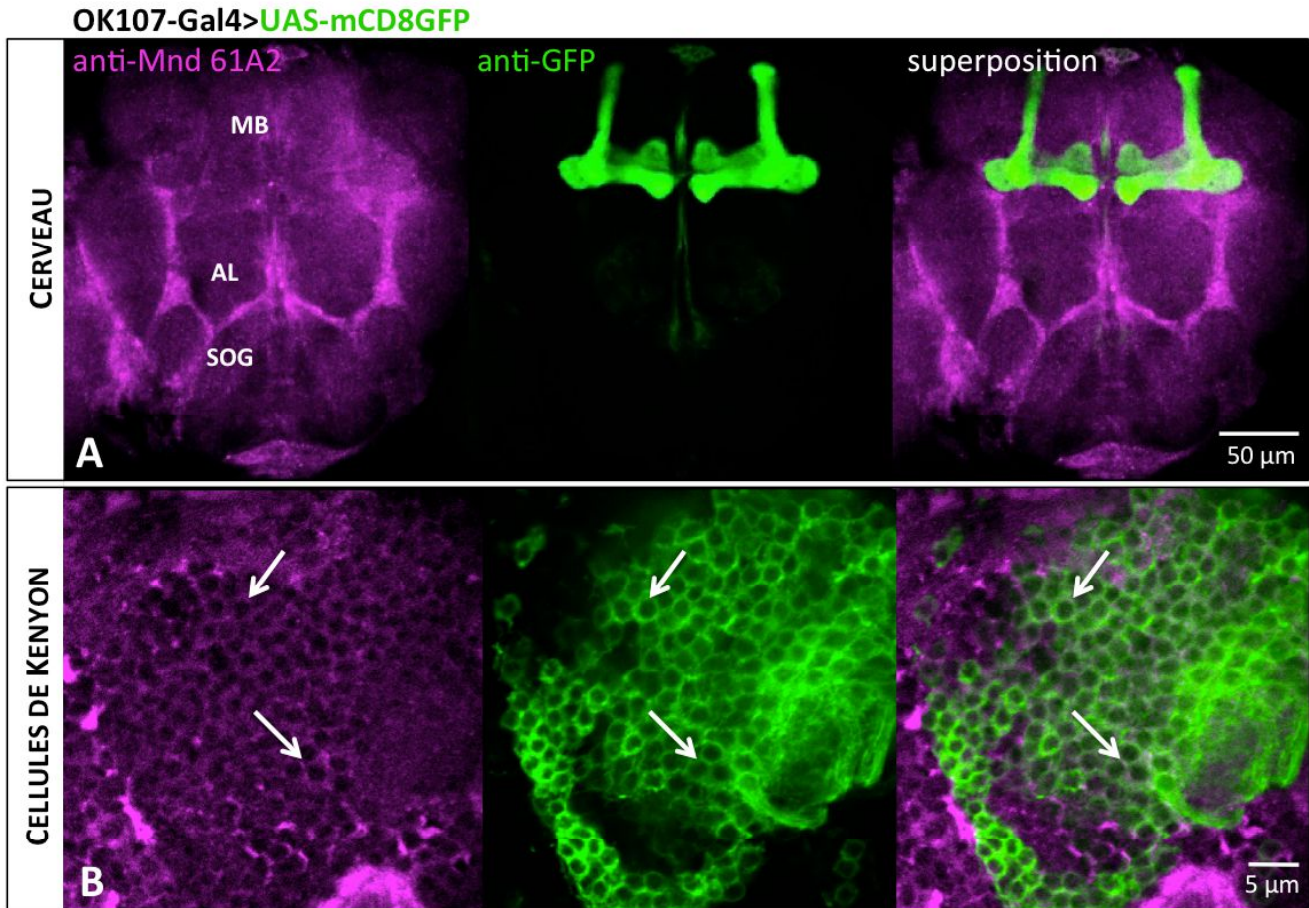
Quantification du signal relatif de l'anticorps anti-Mnd 61A2 au niveau des cellules de Kenyon de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP et 24-1-Gal4> UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK;UAS-mCD8GFP Le signal de l'anticorps anti-Mnd 61A2 (mesuré par ImageJ) pour les cellules où s'exprime *Gal4* sous la dépendance de la séquence régulatrice 24-1 (marquées par la GFP) est rapporté au signal pour les cellules où *Gal4* n'est pas exprimé (non marquées par la GFP). n = nombre de cerveaux analysés pour le calcul du ratio de signal relatif (test statistique: Mann-Whitney; significativité: \*\* = p<0,01).

#### d) Profil d'expression de *minidiscs* dans les neurones des corps pédonculés

Comme il est peu probable que les séquences 24-1, 25-1, 26-1 et 27-1 couvrent l'ensemble des régions génomiques impliquées dans la régulation de l'expression de *mnd*, leurs profils d'expression ne représentent vraisemblablement pas de manière exhaustive le profil d'expression de *mnd* dans le cerveau. Ainsi, lors des doubles marquages réalisés sur des cerveaux de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP avec des anticorps anti-GFP et anti-Mnd 61A2, la présence de cellules marquées par les anticorps anti-Mnd et non par la GFP autour des calices suggère que l'expression de *mnd* dans les corps pédonculés ne se limite pas aux neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  (Figure 50 et Figure 53A).

Afin de préciser le profil d'expression de *mnd* dans les corps pédonculés, différentes lignées Gal4 bien décrites dans la littérature ont été utilisées (Aso *et al.*, 2009) (*cf.* Partie 1-d du matériel et méthodes; Tableau XVIII). Les doubles marquages réalisés sur des

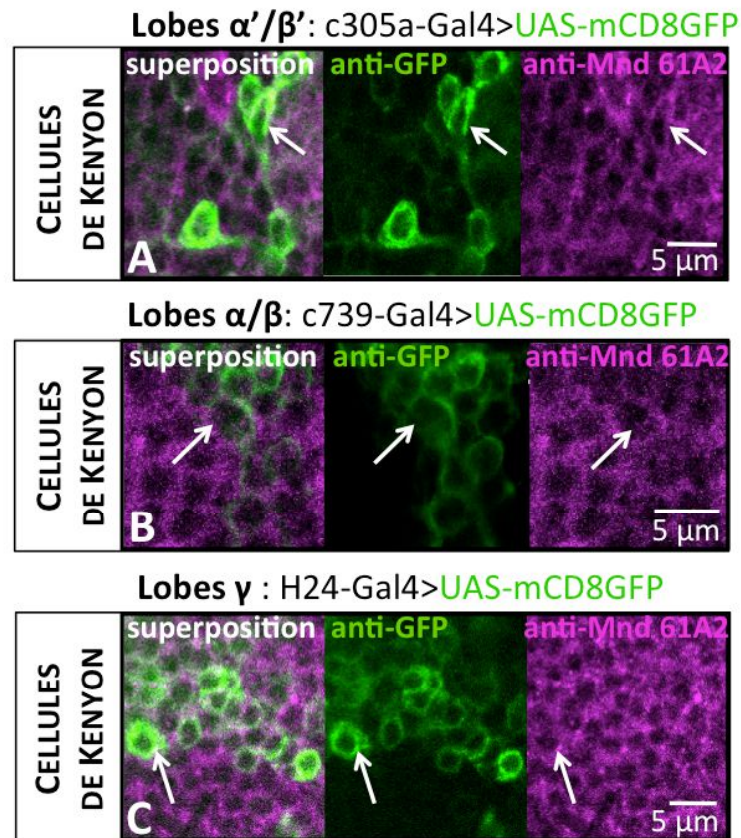
drosophiles exprimant la GFP dans l'ensemble des neurones formant les lobes des corps pédonculés (OK107-Gal4>UAS-mCD8GFP) avec des anticorps anti-Mnd 61A2 et anti-GFP confirment que Mnd est localisé au niveau du soma des cellules de Kenyon (Figure 55B) et non au niveau des axones (Figure 55A).



**Figure 55 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice OK107 spécifique des neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$ ,  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles OK107-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau de la partie antérieure du cerveau (A) et des cellules de Kenyon (B) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal); MB: Corps Pédonculés; AL: Lobes Antennaires; SOG: Ganglion sous-œsophagien.

Pour savoir si *mnd* est exprimé dans chaque type de neurones formant les lobes des corps pédonculés, des lignées spécifiques de chacun de ces lobes ont été utilisées. En effet, une fois croisée avec la lignée UAS-mCD8-GFP, la lignée c305a permet de marquer les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés (Figure 56A), la lignée c739 permet de marquer les neurones des lobes  $\alpha/\beta$  (Figure 56B) et la lignée H24 permet de marquer les neurones des lobes  $\gamma$  (Figure 56C).



**Figure 56 : Comparaison entre le profil d'expression de séquences régulatrices spécifiques des différents lobes des corps pédonculés et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**  
 Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles c305a-Gal4>UAS-mCD8GFP (A), c739-Gal4>UAS-mCD8GFP (B) et H24-Gal4>UAS-mCD8GFP (C) avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal au niveau des cellules de Kenyon).

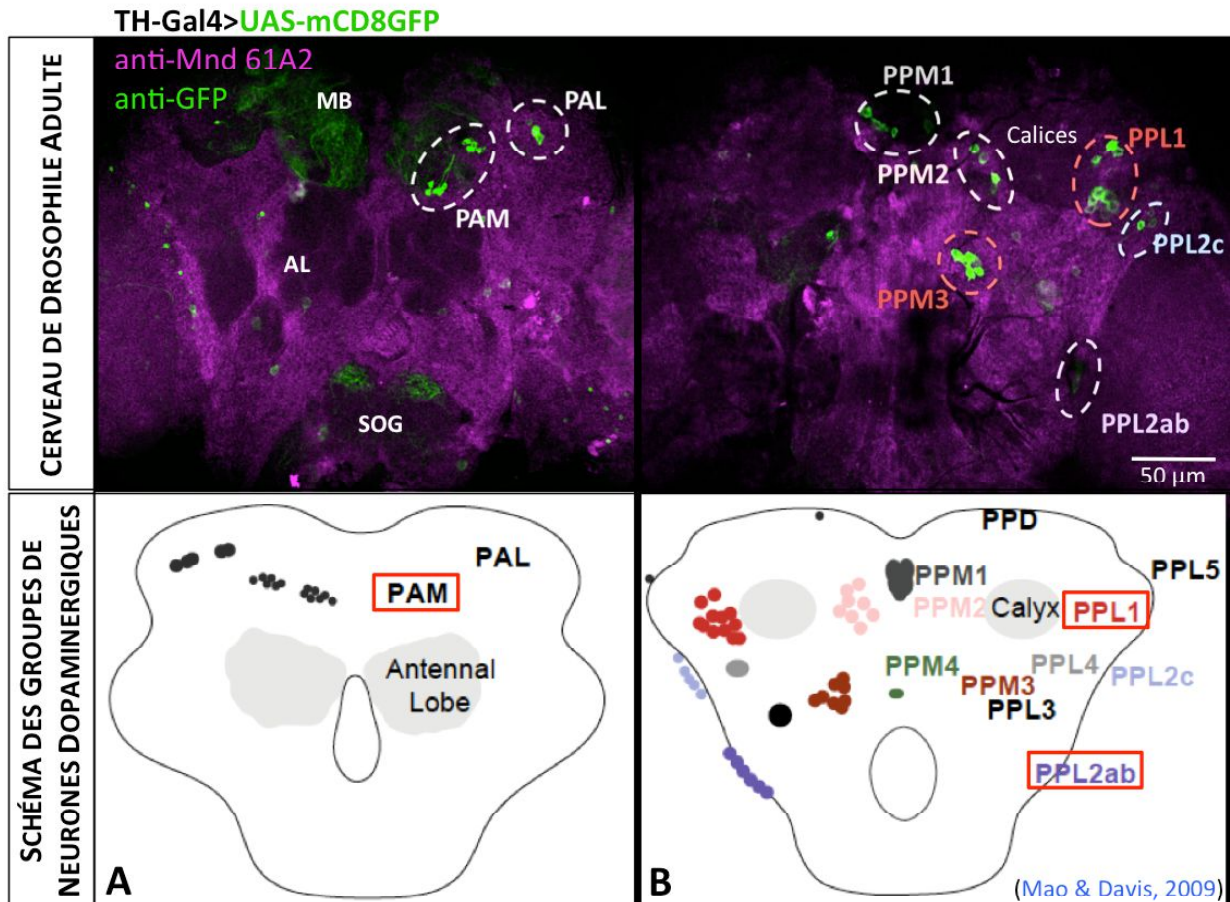
La superposition du signal observable pour ces trois doubles marquages semble indiquer que Mnd est localisé dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  (Figure 56 B et C), ce qui correspond au profil d'expression de 24-1, mais également dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  (Figure 56A).

Par ailleurs, les doubles marquages réalisés avec des anticorps anti-Mnd 61A2 et anti-ElaV indiquent que *mnd* s'exprime dans d'autres neurones que ceux des corps pédonculés (Figure 39A). Afin d'étendre la caractérisation du profil d'expression de *mnd* à d'autres types de neurones, le profil d'expression de *mnd* dans les neurones dopaminergiques associés aux corps pédonculés a été étudié.



e) Profil d'expression de *minidiscs* dans les neurones dopaminergiques associés aux corps pédonculés

La lignée TH-Gal4 a été utilisée pour visualiser les différents groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile adulte après croisement avec la lignée UAS-mCD8GFP (Tableau XVIII; Figure 57).

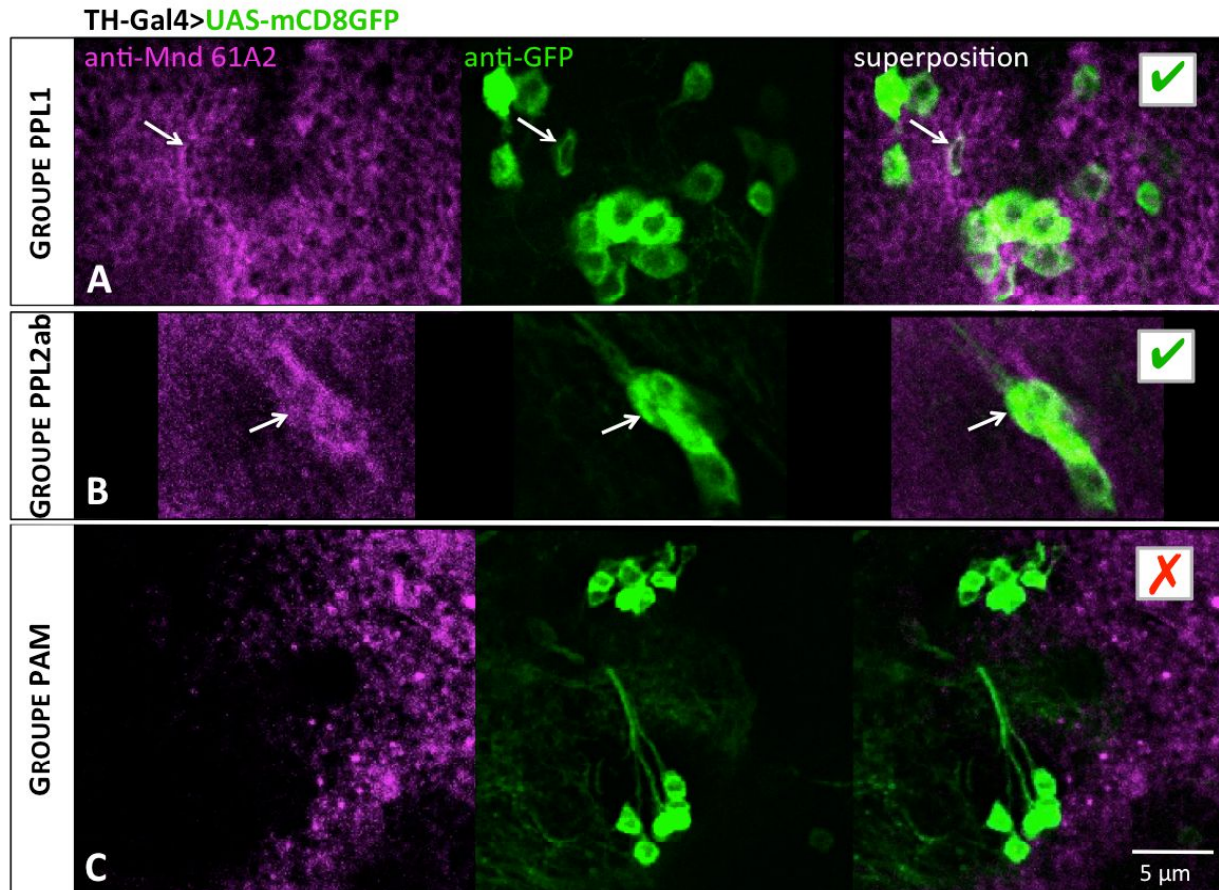


**Figure 57 : Visualisation des différents groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile adulte**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles adultes TH-Gal4>UAS-mCD8GFP avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau de la partie antérieure (A) et postérieure du cerveau (B) et schématisation de la localisation des différents groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile adulte (d'après Mao et Davis, 2009); MB: Corps Pédonculés; AL: Lobes Antennaires; SOG: Ganglion sous-œsophagien; les différents groupes de neurones dopaminergiques sont encerclés; les groupes de neurones dopaminergiques innervant les corps pédonculés sont encadrés en rouge sur les schémas.

La lignée TH-Gal4 permet notamment de visualiser les groupes PAM, PPL1 et PPL2ab qui rassemblent les trois types de neurones dopaminergiques afférents aux corps pédonculés (Figure 58) (Mao et Davis, 2009). Des doubles marquages ont été réalisés sur cerveaux de drosophiles TH-Gal4>UAS-mCD8GFP avec des anticorps anti-Mnd 61A2 et des anticorps anti-GFP. La superposition du signal Mnd et GFP observable pour les groupes PPL1 et PPL2ab (Figure 58 A et B) indique que Mnd semble être localisé dans les neurones

dopaminergiques des groupes PPL1 et PPL2ab. Par contre, aucune superposition du signal n'a pu être observée pour le groupe PAM (Figure 58 C), ce qui pourrait suggérer que Mnd n'est pas localisé dans ce groupe de neurones. Cependant, alors que le groupe PAM est composé d'une centaine de neurones dopaminergiques par hémisphère, la séquence régulatrice TH s'exprime seulement dans 12 à 13 neurones dopaminergiques PAM (Mao et Davis, 2009).

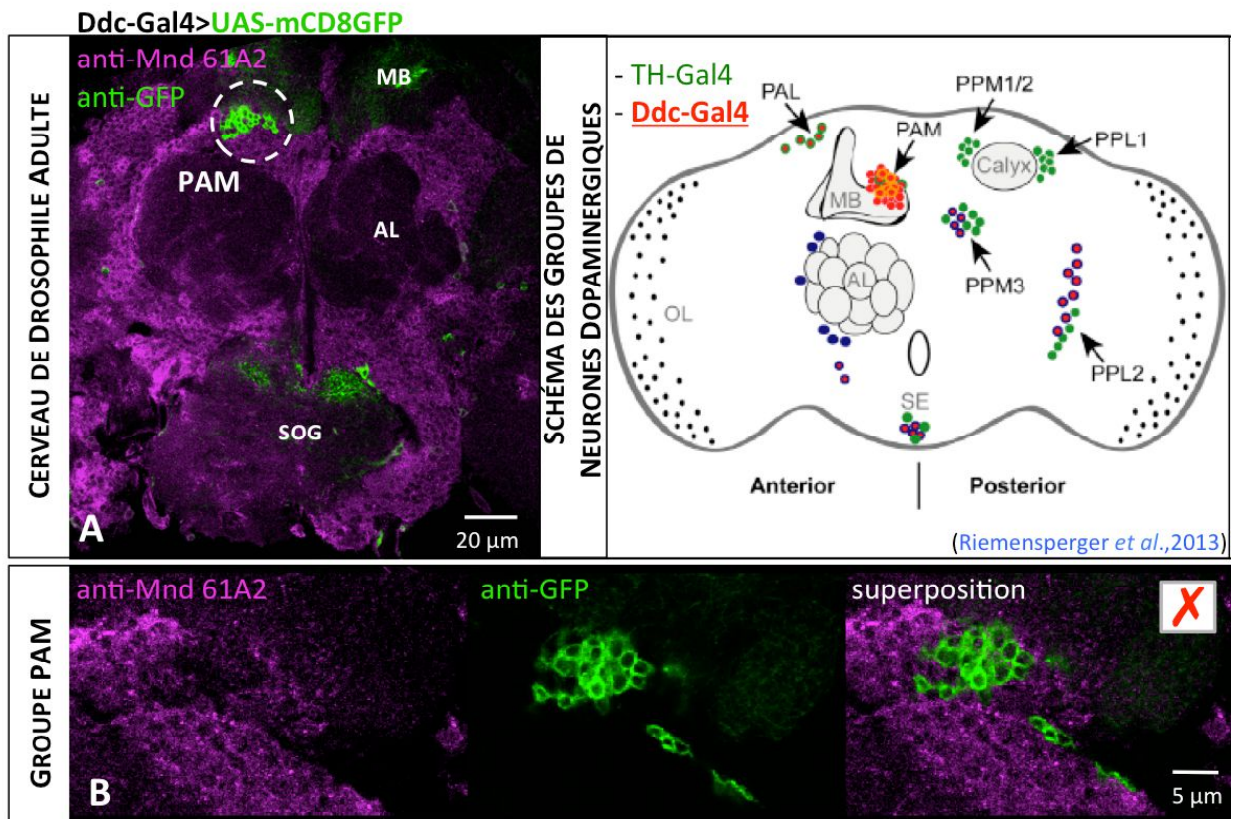


**Figure 58 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquences TH dans les groupes de neurones dopaminergiques PPL1, PPL2ab et PAM et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles TH-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau des groupes de neurones dopaminergiques PPL1 (A), PPL2ab (B) et PAM (C) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal au niveau des neurones dopaminergiques innervant les corps pédonculés).

Afin de savoir si l'absence de superposition du signal est due au faible nombre de cellules ciblées par ce promoteur, d'autres doubles marquages ont été effectués en utilisant la lignée Ddc-Gal4 (Tableau XVIII ; Figure 59A). Cette lignée permet de marquer un plus grand nombre de neurones du groupe PAM après croisement avec la lignée UAS-mCD8GFP (Riemensperger *et al.*, 2013).

Malgré le plus grand nombre de cellules exprimant la GFP dans ce groupe, les doubles marquages sur cerveaux de drosophiles *Ddc-Gal4>UAS-mCD8GFP* n'ont pas non plus permis d'observer de superposition du signal Mnd et GFP (Figure 59B). Ces résultats suggèrent que Mnd ne semble pas être localisé dans les neurones dopaminergiques PAM.



**Figure 59 : Visualisation du groupe de neurones dopaminergiques PAM dans le cerveau de drosophile adulte et comparaison entre le profil d'expression de la séquences *Ddc* dans le groupe PAM et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles *Ddc-Gal4>UAS-mCD8GFP* adultes avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau de la partie antérieure (A) et au niveau du groupe PAM (B) et schématisation de la localisation des différents groupes de neurones dopaminergiques dans le cerveau de drosophile adulte (d'après Riemensperger *et al.*, 2013); MB : Corps Pédonculés ; AL : Lobes Antennaires ; SOG : Ganglion sous-œsophagien ; le groupe de neurones dopaminergiques PAM est encerclé et apparaît en rouge sur le schéma.

#### f) Discussion et perspectives

Pour étudier le rôle et la fonction de *mnd* dans le système nerveux, des recherches bioinformatiques ont été effectuées et ont permis de s'assurer que ce gène pourrait être exprimé dans le cerveau de la drosophile adulte.

Ces recherches ont également permis de mettre en évidence l'existence putative de quatre transcrits de *mnd* (Figure 35). Les expériences de RT-PCR ont montré que les transcrits *mnd-RC*, *RA* et *RE* sont bien exprimés dans les têtes de drosophiles. Ceci n'a pas

pu être prouvé pour le transcrit *mnd-RD*. Afin de savoir si cette absence d'amplification reflète l'absence d'expression de ce transcrit dans les têtes de drosophiles ou un problème avec les amorces spécifiques de ce transcrit, des RT-PCR à partir d'ADNc de drosophiles entières ont été réalisées, sans plus de succès. Ce résultat indique soit que ce transcrit n'est pas présent ou très faiblement exprimé, soit que les amorces choisies ne permettent pas de l'amplifier malgré les différents tests effectués.

La spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A2 en immunohistologie a été vérifiée en utilisant des drosophiles sur-exprimant ou sous-exprimant *mnd* et en observant l'augmentation ou la diminution du signal Mnd (Figure 52 et Figure 53). Par ailleurs, la diminution du marquage observée dans le soma des neurones des corps pédonculés pour les drosophiles 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK;UAS-mCD8GFP prouve que Mnd est bien présent dans les cellules de Kenyon (Figure 53B).

Lors de la tentative de délétion de *mnd*, les résultats de PCR obtenus pour la lignée #25 semblent indiquer que cette lignée a bien subi une délétion de l'exon 1 de *mnd* (Figure 44). Pourtant, aucune diminution du signal de l'anticorps anti-Mnd 61A2 n'est observable sur les cerveaux de larves de cette lignée par rapport à la lignée témoin (Figure 45). Sachant que cet anticorps reconnaît bien la protéine Mnd, ce résultat pourrait s'expliquer par la synthèse d'une protéine Mnd tronquée à partir des exons 2 à 4 de *mnd*, non ciblés par la délétion. En effet, d'autres codons ATG sont présents dans le même cadre de lecture que l'ATG Start qui est délété. L'un de ces codons pourrait avoir servi de nouveau point de départ de la traduction et mener à la synthèse d'une protéine tronquée toujours reconnue du côté C-ter par l'anticorps. Cette protéine tronquée serait alors non fonctionnelle ce qui expliquerait la létalité observée au delà du 3<sup>ème</sup> stade larvaire et la réduction de la taille des lobes, conformément aux observations de Martin et collaborateurs (Martin *et al.*, 2000).

La superposition du signal des anticorps anti-GFP et anti-Mnd 61A2 observable pour les co-marquages réalisés sur cerveaux de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP et 25-1-Gal4>UAS-mCD8GFP indique que le profil d'expression des séquences 24-1 et 25-1 est bien représentatif de l'expression de *mnd* (Figure 50 et Figure 51). Cependant, d'autres cellules non marquées par la GFP sont marquées par l'anticorps anti-Mnd 61A2. Ce résultat suggère que le profil d'expression des séquences 24-1 et 25-1 (ainsi que 26-1 et 27-1) ne représente pas le profil d'expression de *mnd* de façon exhaustive. C'est ce qui a en effet été confirmé par les doubles marquages réalisés à partir de lignées Gal4 spécifiques des neurones formant les différents lobes des corps pédonculés ou des neurones dopaminergiques. Afin de poursuivre la caractérisation du profil d'expression neuronal et

glial de *mnd*, d'autres lignées Gal4 spécifiques des différents types de neurones (complexe central, corne latérale, neurones DPM, neurones APL,...) ou des différents types de cellules gliales (cortex, sous-perineurales, engainantes,...) pourraient être utilisées.

L'ensemble de ces expériences a permis de s'assurer que Mnd est bien présent dans le système nerveux central de la drosophile adulte et notamment au niveau des neurones des corps pédonculés (sous la dépendance de la séquence régulatrice 24-1) et des cellules gliales du cortex (sous la dépendance de la séquence régulatrice 25-1). Mnd étant exprimé dans le cerveau, ce transporteur pourrait être impliqué dans le fonctionnement nerveux. Afin d'étudier le rôle de Mnd dans le système nerveux, l'effet de la dérégulation de l'expression de *mnd* a été observé sur différents comportements. Les comportements étudiés ont été choisis en fonction des rôles connus des structures cérébrales dans lesquelles la présence de Mnd a pu être détectée. Le type de comportement modifié pourrait alors donner des indications sur la fonction de Mnd dans le système nerveux central.

## Partie 2 : Rôle de Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux central

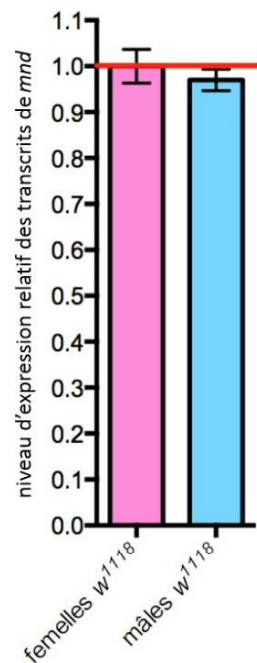
L'expression de Mnd dans le cerveau de drosophile suggère que la fonction de cette protéine ne se limite pas uniquement à son rôle de transporteur d'acides aminés dans le tissu adipeux (Martin *et al.*, 2000). Mnd pourrait ainsi être également impliqué dans le fonctionnement du système nerveux.

Quatre types de tests comportementaux ont été choisis pour étudier l'incidence potentielle de Mnd sur le fonctionnement du système nerveux en réduisant l'expression de Mnd dans des sous-populations spécifiques de neurones ou de cellules gliales.

### a) Validation de l'efficacité des outils génétiques utilisés

Comme les drosophiles femelles et mâles ont été séparées lors des tests de comportement, le niveau d'expression relatif de *mnd* dans les têtes de drosophiles mâles et femelles a été comparé par qPCR et est comparable entre les deux sexes (Figure 60).

Pour vérifier l'efficacité des lignées Gal4 et UAS-ARNi utilisées, le niveau d'expression de *mnd* dans les têtes de drosophiles mâles ou femelles témoins (Gal4/+ et UAS/+) ou mutantes (Gal4>UAS) a été quantifié par qPCR. Le niveau d'expression de *mnd* chez des drosophiles *w<sup>1118</sup>* mâles ou femelles a servi de référence (trait rouge ; Figure 61).



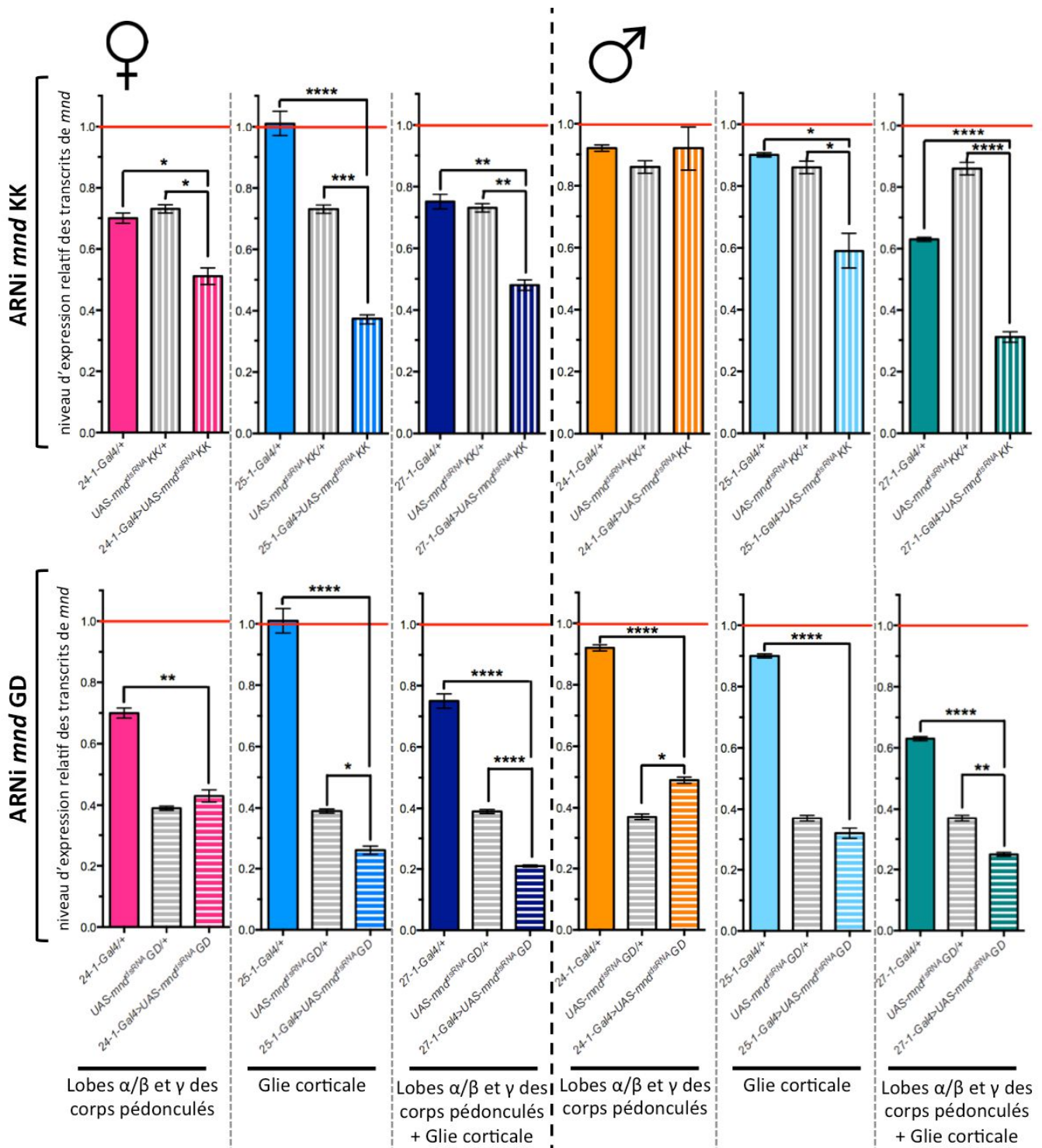
**Figure 60 : Comparaison du niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* dans des têtes de drosophiles témoins (*w<sup>1118</sup>*) femelles et mâles**

Le gène de référence utilisé pour évaluer le niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) est la *tubuline*.

Ces expériences montrent une diminution significative du niveau d'expression de *mnd* chez les drosophiles mutantes, que la production d'ARN interférents soient dirigée dans les neurones des corps pédonculés (séquence 24-1), dans les cellules gliales du cortex (séquence 25-1) ou dans ces deux sous-ensembles de cellules (séquence 27-1) (Figure 61).

Seules les drosophiles mâles exprimant l'ARNi *mnd* KK dans les neurones des corps pédonculés (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK) ne présentent pas de diminution de la quantité de transcrits de *mnd*. À l'exception de ces drosophiles, l'ensemble des mutants exprimant l'ARNi *mnd* KK présente une quantité de transcrits de *mnd* significativement inférieure aux drosophiles témoins (Gal4/+ et UAS/+).

Pour les mutants exprimant l'ARNi *mnd* GD, la diminution de la quantité de transcrits de *mnd* est comparable à celle observée pour la lignée UAS-ARNi seule (UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD/+). La « fuite » des ARNi dirigés contre les transcrits de *mnd* observée pour cette lignée suggère que l'insertion du transgène UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD a eu lieu dans une région génomique activant sa transcription. Ainsi le transgène UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD est susceptible d'avoir un effet phénotypique sans combinaison avec une séquence Gal4.

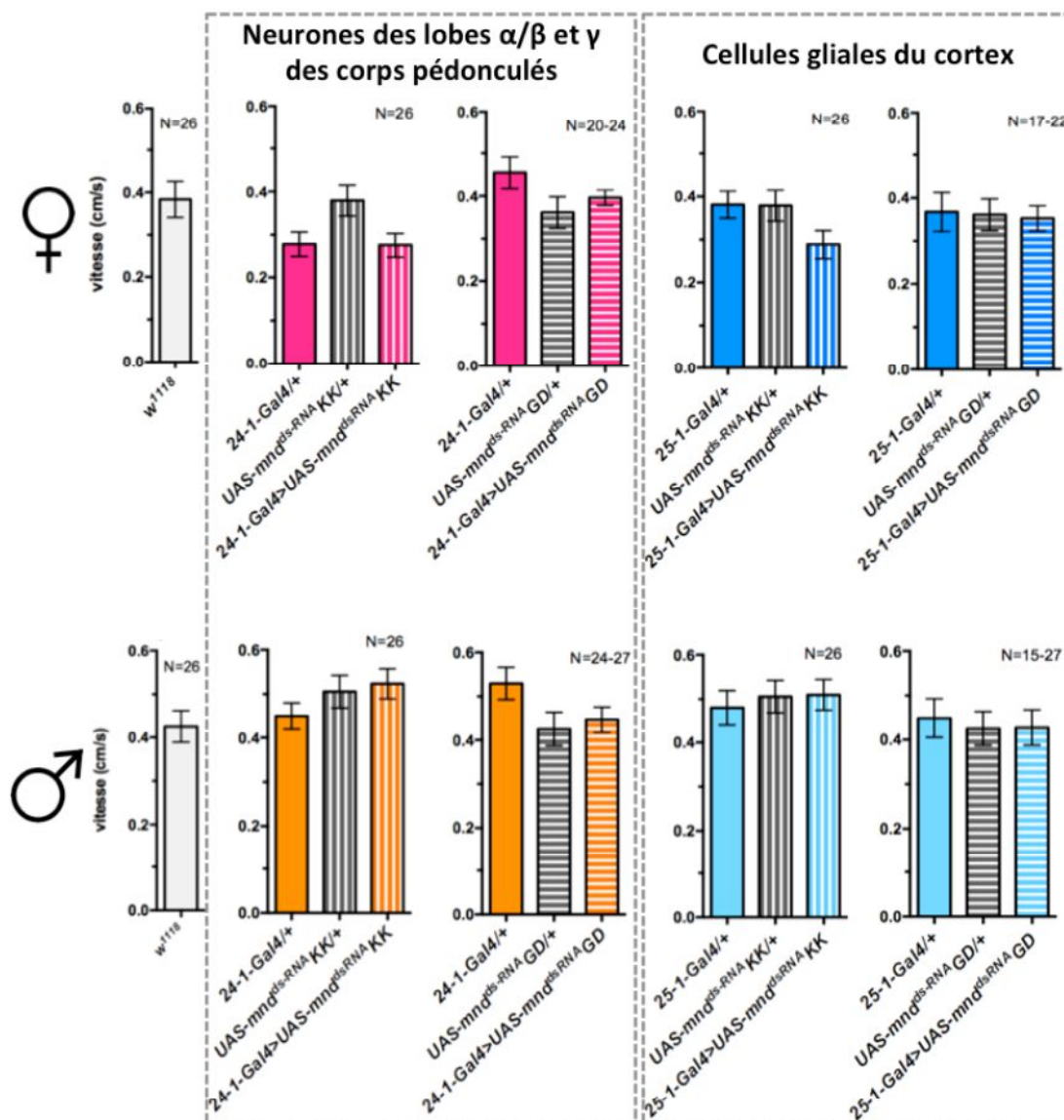


**Figure 61 : Vérification de l'efficacité des différentes lignées Gal4 et UAS-ARNi sur le niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* dans les têtes de drosophiles femelles et mâles**

Niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* dans des têtes de drosophiles témoins (24-1-Gal4/+ ; 25-1-Gal4/+ ; 27-1-Gal4/+ ; UAS-*mnd*<sup>dsRNAKK</sup>/+ ; UAS-*mnd*<sup>dsRNA GD</sup>/+) et mutants (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNAKK</sup> ; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNAKK</sup> ; 27-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNAKK</sup> ; 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA GD</sup> ; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA GD</sup> ; 27-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA GD</sup>). Le gène de référence utilisé pour évaluer le niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) est la *tubuline*. Des drosophiles *w<sup>1118</sup>* ont été utilisées pour la condition de référence (test statistique : one-way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey en comparant entre eux les  $\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$  obtenus entre génotypes témoins et mutants; significativité : \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

b) Étude du rôle de *Minidiscs* dans l'activité locomotrice

La séquence 24-1 régule l'expression de *mnd* dans les neurones des corps pédonculés et la séquence 25-1 dans les cellules gliales du cortex (Figure 46). Compte tenu de son profil d'expression, la dérégulation de l'expression de *mnd* pourrait modifier l'activité locomotrice des drosophiles. En effet, il a été montré que les corps pédonculés sont impliqués dans l'augmentation de l'activité locomotrice initiale des drosophiles dans les 15 premières minutes de test (Serway *et al.*, 2009) puis dans la suppression de cette activité après plusieurs heures de tests (Martin *et al.*, 1998). L'implication des cellules gliales dans l'activité locomotrice a quant à elle été démontrée chez la larve (Pereanu *et al.*, 2007).



**Figure 62 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur l'activité locomotrice initiale des drosophiles**

Tests d'activité locomotrice en éthovision réalisés sur 10 minutes sur des drosophiles témoins (*w<sup>1118</sup>*; 24-1-Gal4/+; 25-1-Gal4/+; UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK/+; UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD/+ ) et mutantes (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK; 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD). Tests statistiques : one-way ANOVA; N = nombre de réplicats.



Pour déterminer si la diminution du niveau d'expression de *mnd* modifie l'activité locomotrice des drosophiles, leur vitesse de déplacement sur 10 minutes (activité locomotrice initiale) a été comparée à celle de drosophiles témoins. Ces tests n'ont pas permis d'observer de différence significative entre les différents génotypes (Figure 62). *Mnd* ne semble donc pas avoir de rôle sur l'activité locomotrice initiale des drosophiles.

Par ailleurs, ces tests nous indiquent que les drosophiles présentant une diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les corps pédonculés ou dans la glie corticale ne semblent pas avoir de problèmes locomoteurs. Cette information est importante pour la réalisation d'autres tests comportementaux qui nécessitent le déplacement des drosophiles dans un dispositif expérimental, comme c'est le cas des tests de choix olfactif ou d'apprentissage. Dans ce type de test, les résultats peuvent être biaisés si les drosophiles ne se déplacent pas correctement dans le dispositif car la réponse comportementale observée ne dépend plus uniquement du comportement testé (capacités olfactives, mémorisation,...).

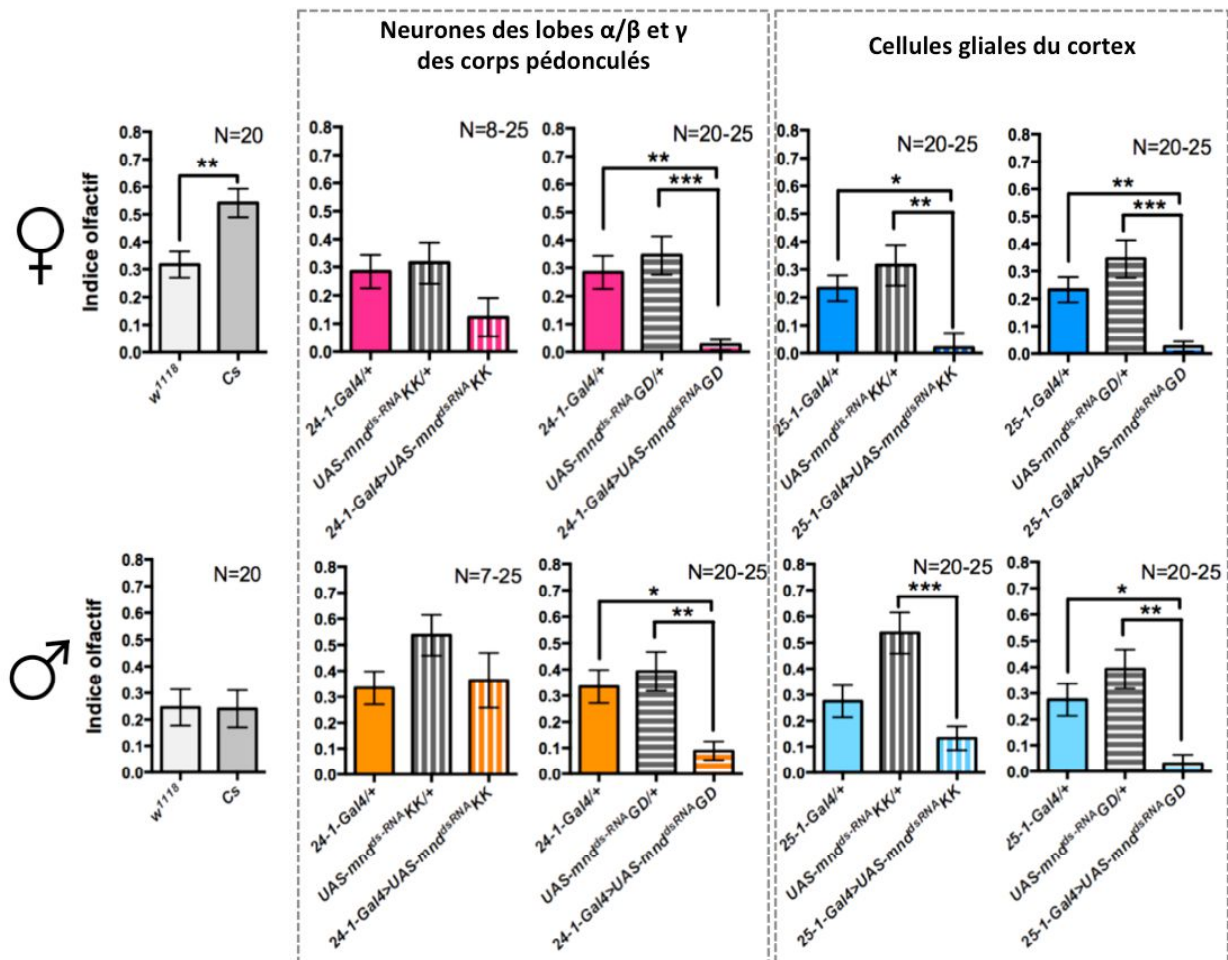
### c) Étude du rôle de *Minidiscs* dans la perception olfactive

Compte tenu du profil d'expression de *mnd* dans les neurones des corps pédonculés (centres olfactifs secondaires) et dans les cellules gliales du cortex qui entourent différents centres nerveux tels que les lobes antennaires (centres olfactifs primaires) (Figure 46), *Mnd* pourrait avoir un rôle dans le traitement de l'information olfactive. En effet, il a été montré que les neurones des corps pédonculés sont impliqués dans la réponse aux odeurs attractives mais non aux odeurs répulsives (Wang *et al.*, 2003). Les cellules gliales entourant les lobes antennaires sont quant à elles impliquées dans le développement du système olfactif (Sakurai *et al.*, 2009) et pourraient moduler la perception de certains odorants tels que le *cis*-vaccenyl acetate (Grosjean *et al.*, 2008).

Pour déterminer si la diminution du niveau d'expression de *mnd* a une incidence sur la perception olfactive des drosophiles, leurs réponses olfactives ont été comparées à celles de témoins avec un test de choix pour une odeur de nourriture (Figure 63).

Une diminution significative de la réponse olfactive des drosophiles a ainsi pu être observée, que le niveau d'expression de *mnd* soit diminué dans les neurones des centres olfactifs secondaires (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD) ou dans les cellules gliales du cortex proches des centres olfactifs (25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD). Seuls les indices olfactifs des drosophiles mâles et femelles exprimant l'ARNi *mnd* KK dans les neurones des corps pédonculés (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK) ne sont pas différents des indices olfactifs des drosophiles témoins (Figure 63). Ce résultat peut s'expliquer par l'absence de diminution de la quantité de transcrits de *mnd* chez les drosophiles mâles 24-

1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK par rapport aux drosophiles témoins et par la faible diminution de la quantité de transcrits de *mnd* (environ 25%) chez les drosophiles femelles 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK (Figure 61).

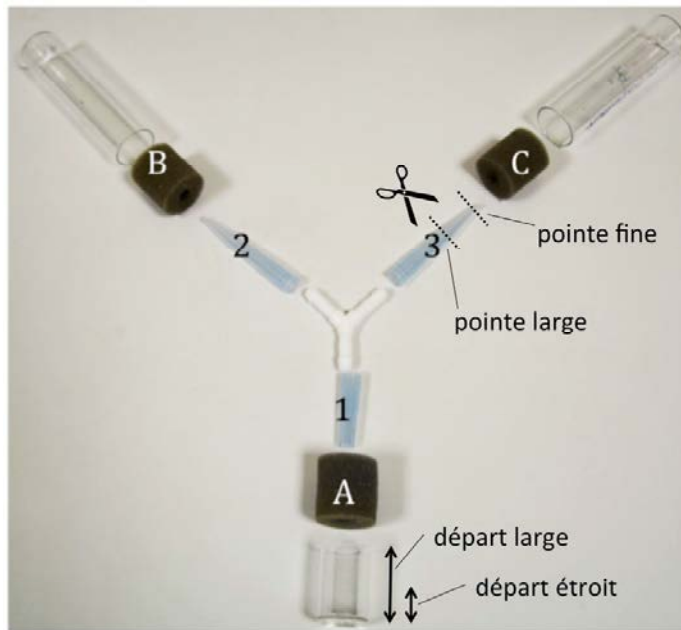


**Figure 63 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la perception olfactive des drosophiles**

Tests en Y en lumière rouge réalisés sur des drosophiles témoins ( $w^{1118}$ ; Cs; 24-1-Gal4/+; 25-1-Gal4/+; UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK/+; UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD/+ ) et mutants (24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK; 24-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD; 25-1-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>GD) sur 4 heures de test. Tests statistiques : test t de Student pour comparer  $w^{1118}$  et Cs ; one-way ANOVA suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey lorsque la distribution des valeurs est Gaussienne ; Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn lorsque la distribution des valeurs ne suit pas une loi normale ; significativité : \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$  ; N = nombre de réplicats.

Cependant, d'importants problèmes de participation ont été constatés lors de ces tests puisque beaucoup de drosophiles ne quittaient pas le tube de départ. Les différences de taux de participation entre les différents génotypes pouvant être à l'origine du phénotype observé, différents ajustements ont donc été réalisés afin d'obtenir un indice de participation maximal des drosophiles. Ces ajustements ont porté sur trois paramètres : la place laissée aux drosophiles dans le tube de départ (en enfonçant plus ou moins le

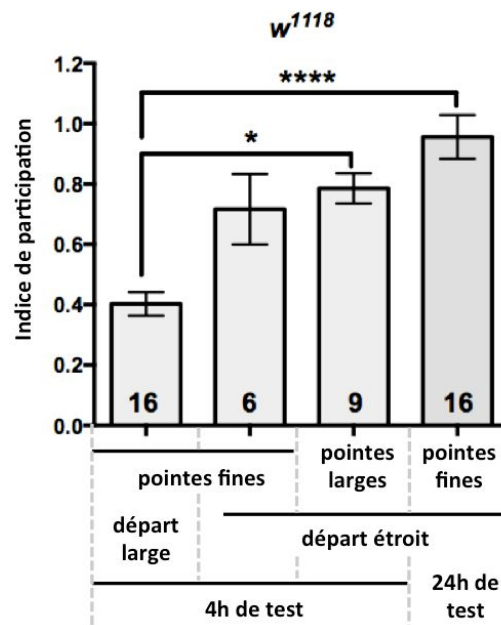
bouchon A dans le tube de départ, Figure 64), le diamètre des embouts 2 et 3 du Y (Figure 64) et la durée du test.



**Figure 64 : Représentation « éclatée » d'un dispositif en Y**

A : Bouchon du tube de départ ; B et C : Bouchons des tubes contenant de la nourriture ou de l'agar ; 1 : Connecteurs pour l'entrée dans le Y ; 2 et 3 : Pointes permettant l'entrée dans le tube de nourriture ou d'agar.

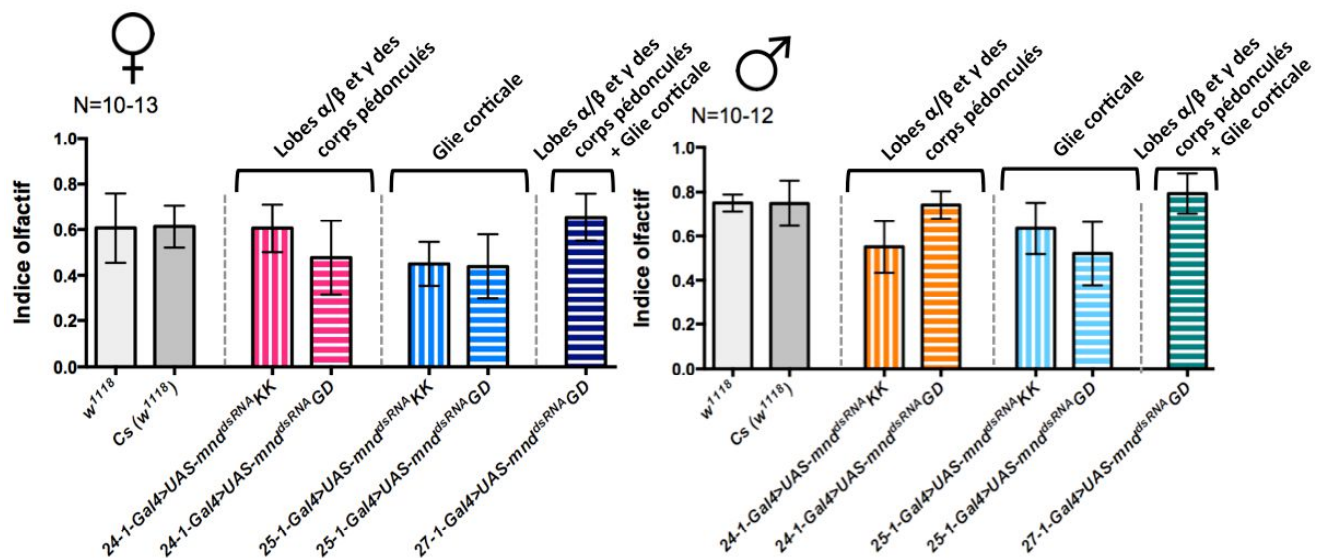
Lors de la première série de tests, beaucoup de place était laissée aux drosophiles dans le tube de départ et la durée du test était de 4 heures. Le diamètre des pointes était suffisamment étroit pour ne pas permettre le retour des drosophiles une fois leur choix réalisé entre tube de nourriture et d'agar. Dans ces conditions, seules 40% des drosophiles participent aux tests en moyenne (tests réalisés sur des drosophiles témoins  $w^{1118}$  ; Figure 65). Lorsque l'espace du tube de départ a été réduit (5 mm entre le fond du tube et le début du bouchon A), un fort taux de participation (de 70 à 80%) a été constaté après 4 heures de test, quelque soit le diamètre des embouts 2 et 3 du Y (des diamètres de 1,5 mm et 5 mm ont été testés). Le diamètre des embouts 2 et 3 du Y n'influençant pas drastiquement la participation des drosophiles, les embouts de 1,5 mm ont été conservés. Ces derniers empêchent le retour des drosophiles dans le Y une fois leur choix réalisé contrairement aux embouts de 5 mm de diamètre. Lorsque la durée du test est augmentée à 24 heures avec des pointes fines et un départ étroit, le taux de participation est supérieur à 90%. Ce sont donc ces conditions qui ont été conservées pour réaliser une seconde série de tests (Figure 65).



**Figure 65 : Effet du diamètre de l'embout des pointes du dispositif en Y, de l'espace dans le tube de départ et de la durée du test sur le taux de participation lors des tests de choix olfactif**

Tests en Y en lumière rouge réalisés sur des drosophiles témoins ( $w^{1118}$ ) en faisant varier le diamètre de l'embout des pointes du Y, l'espace dans le tube de départ et la durée du test. Tests statistiques : Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn ; significativité : \* =  $p < 0,05$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  ; le nombre de réplicats pour chaque condition est indiqué dans la barre d'histogramme correspondante.

Lors de cette seconde série de tests, aucune différence significative n'a pu être observée entre lignées témoins et mutantes (Figure 66).



**Figure 66 : Effet de la diminution du niveau d'expression de  $mnd$  dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la perception olfactive des drosophiles (deuxième série de tests après ajustement)**

Tests en Y en lumière rouge réalisés sur des drosophiles témoins ( $w^{1118}$ ; Cs) et mutantes (24-1-Gal4>UAS- $mnd^{dsRNAKK}$  ; 25-1-Gal4>UAS- $mnd^{dsRNAKK}$  ; 24-1-Gal4>UAS- $mnd^{dsRNA GD}$  ; 25-1-Gal4>UAS- $mnd^{dsRNA GD}$  ; 27-1-Gal4>UAS- $mnd^{dsRNA GD}$ ) sur 24 heures de test. Tests statistiques : Mann-Whitney pour comparer chaque génotype à  $w^{1118}$  ; N = nombre de réplicats.

Ce résultat suggère que les différences d'indices de participation pourraient être à l'origine du phénotype observé lors de la première série de tests.

L'obtention d'indices olfactifs significativement supérieurs à 0 (tests t de Student) indique que ce paradigme fonctionne dans ces conditions puisque les drosophiles présentent une attraction pour l'odeur de nourriture. Cette seconde série de résultats indique que la diminution de l'expression de *mnd* dans les corps pédonculés ou dans la glie corticale ne semble pas entraîner de perturbation de la perception olfactive des drosophiles pour des odeurs de nourriture.

#### d) Étude du rôle de Minidiscs dans l'apprentissage et la mémoire

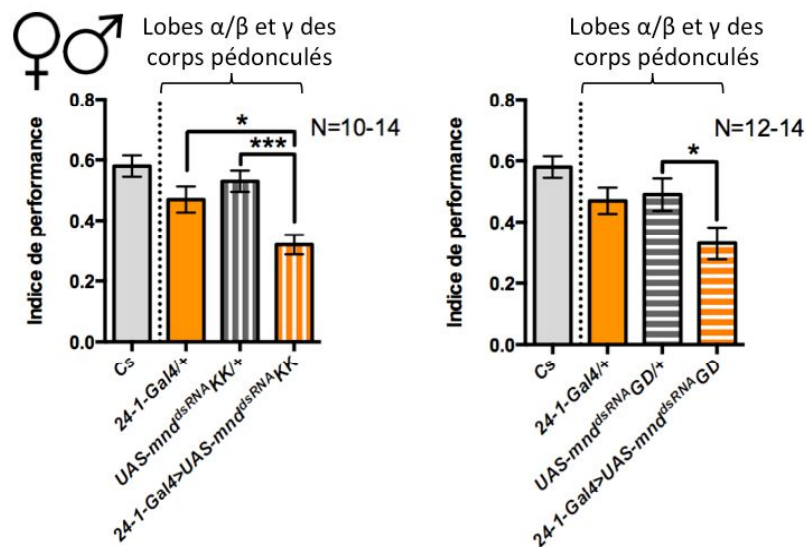
La séquence 24-1 régule l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (Figure 48) et la séquence 25-1 dans les cellules gliales du cortex qui entourent différents centres nerveux dont les calices des corps pédonculés (Figure 46). Les neurones formant les lobes  $\gamma$  sont impliqués dans la mémoire à court terme et dans la détection de la coïncidence temporelle entre stimulus conditionné et non-conditionné (Bouzaiane *et al.*, 2015; Guven-Ozkan et Davis, 2014). Les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  sont quant à eux impliqués dans toutes les formes temporelles de mémoire (Guven-Ozkan et Davis, 2014). Les cellules gliales entourant les neurones des corps pédonculés sont impliquées dans la formation de la mémoire à long terme (Matsuno *et al.*, 2015). Compte tenu de son profil d'expression, Mnd pourrait donc avoir un rôle dans l'apprentissage et la mémoire des drosophiles.

Le travail visant à étudier l'implication de Mnd dans la mémoire olfactive des drosophiles a été réalisé par le Dr. Guillaume Isabel à l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Des tests préliminaires, permettant d'évaluer le rôle de Mnd dans la mémoire olfactive aversive des drosophiles, avaient permis d'observer une diminution significative de l'indice de performance des drosophiles dont le niveau d'expression de *mnd* est diminué dans les neurones des corps pédonculés (Figure 67).

Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par la suite, lors de la réalisation d'une deuxième série de tests (Figure 68). Par ailleurs, ces nouveaux résultats semblent indiquer que le niveau d'expression de *mnd* dans les cellules gliales n'influence pas les capacités d'apprentissage des drosophiles testées.

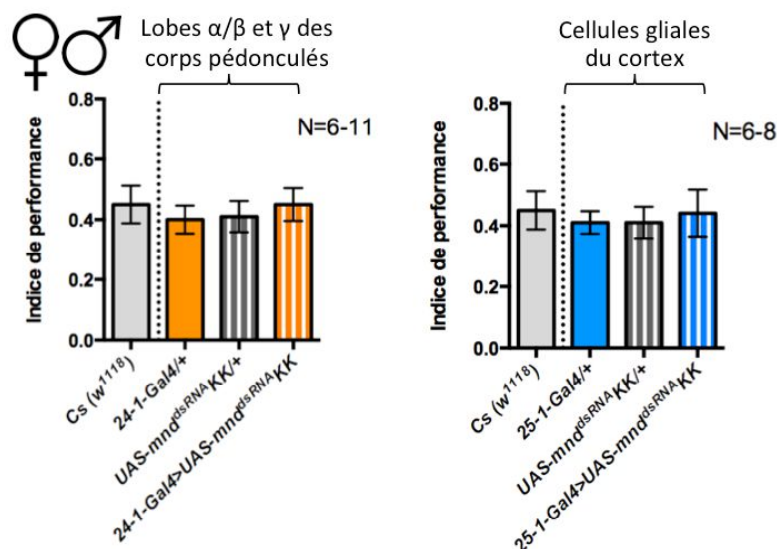
La deuxième série de tests a été réalisée plus d'un an après l'homogénéisation du fond génétique des différentes lignées utilisées. Afin de s'affranchir de potentiels biais expérimentaux liés à une dérive de fonds génétiques, une troisième série de tests sera réalisée avec des lignées fraîchement rétrocroisées sur cinq générations avec une lignée

*w<sup>1118</sup>* possédant un fond génétique *Canton S* (*Cs*). L'exploration de l'implication de *Mnd* dans différentes phases de mémoire à plus ou moins long terme sera réalisée.



**Figure 67 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés sur la mémoire olfactive aversive des drosophiles**

Tests T réalisés sur des drosophiles témoins (*Cs*; *24-1-Gal4/+*; *UAS-mnd<sup>dsRNAKK/+</sup>*; *UAS-mnd<sup>dsRNAGD/+</sup>*) et mutantes (*24-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNAKK</sup>*; *24-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNAGD</sup>*). Tests statistiques : test t de Student pour comparer chaque génotype mutant (*Gal4>UAS*) aux génotypes témoins correspondants (*Gal4/+*; *UAS/+*); significativité : \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; N = nombre de réplicats; Tests réalisés par Guillaume Isabel (1<sup>ère</sup> série).



**Figure 68 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex sur la mémoire olfactive aversive des drosophiles**

Tests T réalisés sur des drosophiles témoins (*Cs* (fond génétique *w<sup>1118</sup>*); *24-1-Gal4/+*; *25-1-Gal4/+*; *UAS-mnd<sup>dsRNAKK/+</sup>*) et mutantes (*24-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNAKK</sup>*; *25-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNAKK</sup>*). Tests statistiques : test t de Student pour comparer chaque génotype mutant (*Gal4>UAS*) aux génotypes témoins correspondants (*Gal4/+*; *UAS/+*); N = nombre de réplicats; Tests réalisés par Guillaume Isabel (2<sup>ème</sup> série).

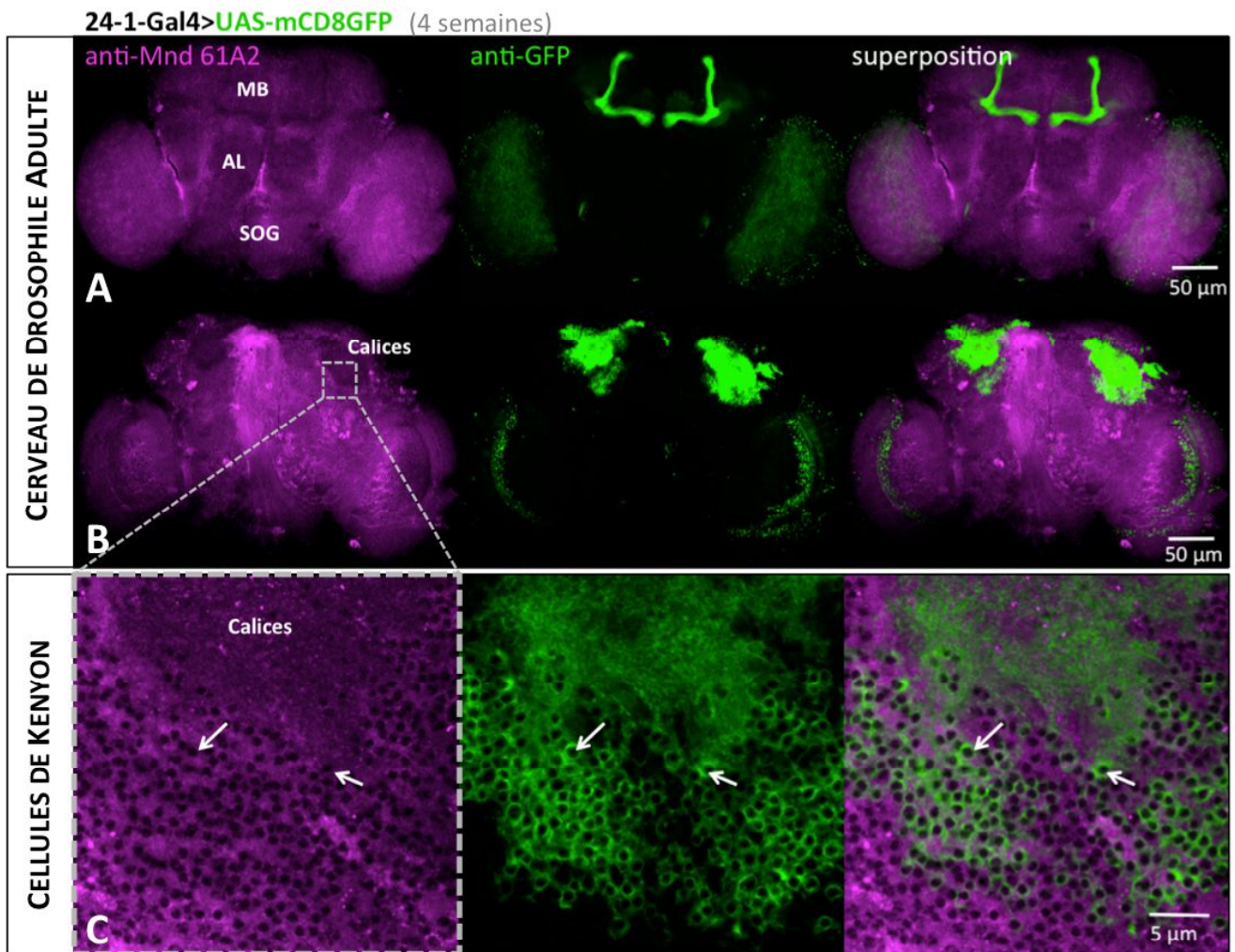
### e) Étude du rôle de Minidiscs sur le réflexe de géotaxie négative

Les cellules gliales ainsi que les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés ont également été décrits pour leur rôle dans le réflexe de géotaxie négative (Ghosh *et al.*, 2011; Riemensperger *et al.*, 2013). Ce réflexe de « climbing » traduit le comportement des drosophiles qui, lorsqu'elles sont placées au fond d'un tube, se dirigent de façon innée vers le haut de celui-ci. Ce comportement étant principalement étudié dans le cadre de recherches sur la neuro-dégénération, les tests de « climbing » sont généralement réalisés sur des groupes de drosophiles suivies sur plusieurs semaines consécutives. Afin de nous conformer à l'un des protocoles décrits dans la littérature, nous avons réalisé des tests sur des drosophiles âgées de 1 à 5 semaines (Barone et Bohmann, 2013).

Dans un premier temps, ces tests ont été réalisés avec des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex en utilisant respectivement les séquences régulatrices de *mnd* 24-1 et 25-1 comme dans nos précédents tests comportementaux.

Des expériences d'immunohistologie sur des cerveaux de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP de 1 à 4 semaines ont été réalisées afin de vérifier que le facteur de transcription Gal4 est bien exprimé tout au long de l'expérience dans les corps pédonculés (seuls les marquages obtenus à 4 semaines sont présentés ; Figure 69).

Ces marquages indiquent que l'expression de 24-1 dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés est bien stable dans le temps. Par ailleurs, ces doubles marquages permettent d'observer une superposition du signal Mnd et GFP au niveau des corps cellulaires des neurones des corps pédonculés (cellules de Kenyon ; Figure 69 B et C) mais pas au niveau des axones (lobes des corps pédonculés ; Figure 69A), conformément aux résultats précédemment obtenus (drosophiles de 1 à 3 jours ; Figure 50). Toutefois, le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd 61A2 au niveau des cellules de Kenyon semble changer d'aspect à partir de 3 semaines et être plus « diffus » au niveau des membranes des cellules, comparé au marquage obtenu sur des drosophiles jeunes (Figure 50C, Figure 53A et Figure 69C).



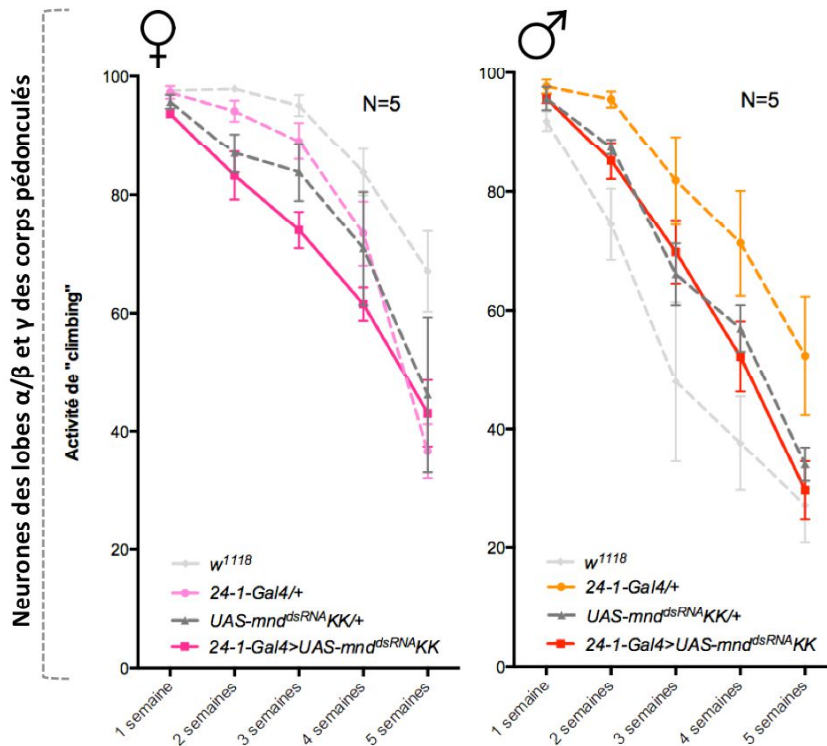
**Figure 69 : Comparaison entre le profil d'expression de la séquence régulatrice 24-1 et le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd pour des drosophiles adultes de 4 semaines**

Doubles marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles 24-1-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes de 4 semaines avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (magenta) et des anticorps anti-GFP (vert) au niveau de la partie antérieure (A) et postérieure du cerveau (B) et au niveau des cellules de Kenyon (C) (les flèches blanches montrent des exemples de superposition du signal); MB : Corps Pédonculés ; AL : Lobes Antennaires ; SOG : Ganglion sous-œsophagien.

Les tests de « climbing » réalisés sur des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés ne permettent pas d'observer de différence significative entre drosophiles mutantes et témoins (Figure 70). Ces résultats semblent indiquer que l'expression de *mnd* dans ces neurones n'a pas d'effet sur le réflexe de géotaxie négative des drosophiles mâles et femelles. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Riemensperger et collaborateurs (Riemensperger *et al.*, 2013).

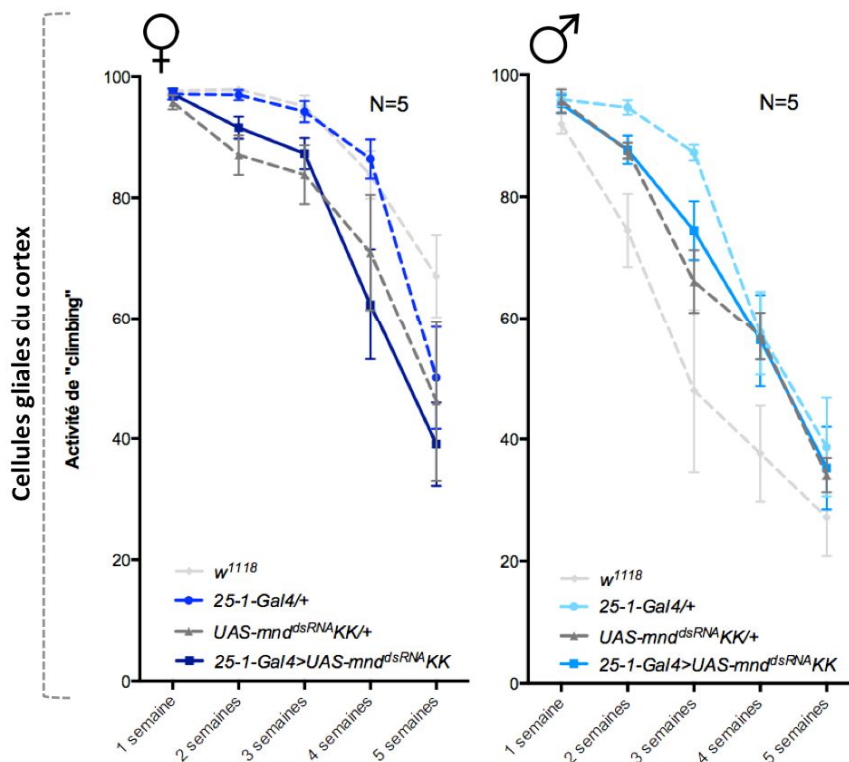
Les tests réalisés sur des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les cellules gliales du cortex ne permettent pas non plus d'observer de différence significative entre drosophiles mutantes et témoins (Figure 71). Ces expériences indiquent que l'expression de *mnd* dans les cellules gliales du cortex n'a pas non plus d'effet sur le réflexe de géotaxie négative des drosophiles mâles et femelles.





**Figure 70 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés sur l'activité de « climbing » des drosophiles**

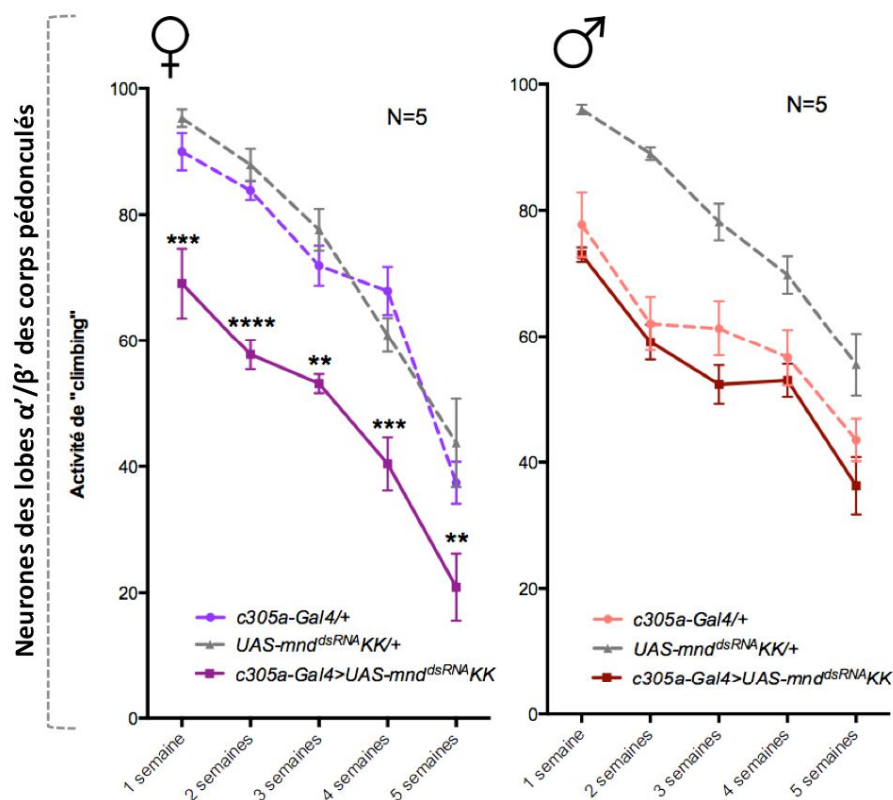
Tests de « climbing » réalisés sur des drosophiles témoins (*w*<sup>1118</sup>; *24-1-Gal4/+*; *UAS-mnd<sup>dsRNA</sup>KK/+*) et mutantes (*24-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNA</sup>KK*) âgées de 1 à 5 semaines. Tests statistiques : two-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey ; N = nombre de réplicats.



**Figure 71 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les cellules gliales du cortex sur l'activité de « climbing » des drosophiles**

Tests de « climbing » réalisés sur des drosophiles témoins (*w*<sup>1118</sup>; *25-1-Gal4/+*; *UAS-mnd<sup>dsRNA</sup>KK/+*) et mutantes (*25-1-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNA</sup>KK*) âgées de 1 à 5 semaines. Tests statistiques : two-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey ; N = nombre de réplicats.

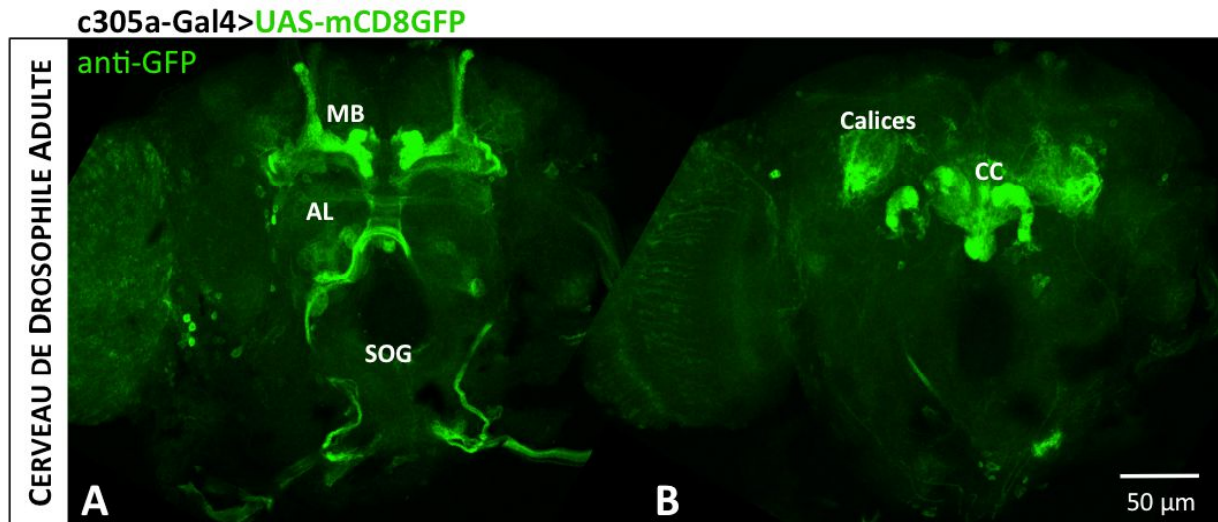
Les expériences menées par Riemensperger et collaborateurs suggèrent que seuls les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés sont impliqués dans le réflexe de géotaxie négative (Riemensperger *et al.*, 2013). Des tests de « climbing » ont donc été réalisés sur des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés en utilisant la séquence régulatrice *c305a*. Ces tests ont permis d'observer une diminution significative de l'activité de « climbing » pour les femelles mutantes en comparaison aux deux lignées témoins (*Gal4/+* et *UAS/+*) (Figure 72). Pour les mâles, l'activité de « climbing » des drosophiles mutantes est significativement plus basse que l'activité de la lignée témoin *UAS/+* mais n'est pas différente de celle de la lignée témoins *Gal4/+* (Figure 72). Ces tests ont été réalisés avant que le fond génétique de la lignée *c305a-Gal4* n'ait été homogénéisé et devront donc être reproduits par la suite après rétrocroisement de cette lignée sur 5 générations avec des drosophiles *w<sup>1118</sup>*. Toutefois, bien que ces tests soient à reproduire, ces résultats semblent indiquer que *Mnd* pourrait intervenir dans le réflexe de géotaxie négative des drosophiles.



**Figure 72 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés sur l'activité de « climbing » des drosophiles**

Tests de « climbing » réalisés sur des drosophiles témoins (*c305a-Gal4/+* ; *UAS-mnd<sup>dsRNAKK</sup>/+*) et mutantes (*c305a-Gal4>UAS-mnd<sup>dsRNAKK</sup>*) âgées de 1 à 5 semaines. Tests statistiques : two-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey ; significativité : \*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$  (la significativité statistique n'est annotée sur les graphes que lorsque les mutants sont différents des deux témoins *Gal4/+* et *UAS/+*) ; N = nombre de réplicats.

Par ailleurs, des marquages sur cerveaux de drosophiles ont montré que la séquence régulatrice c305a ne s'exprime pas uniquement dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés (Figure 73A) mais également au niveau du complexe central (Figure 73B).



**Figure 73 : Visualisation du profil d'expression de la séquence régulatrice c305 dans la partie antérieure (A) et postérieure (B) du cerveau de drosophile adulte**

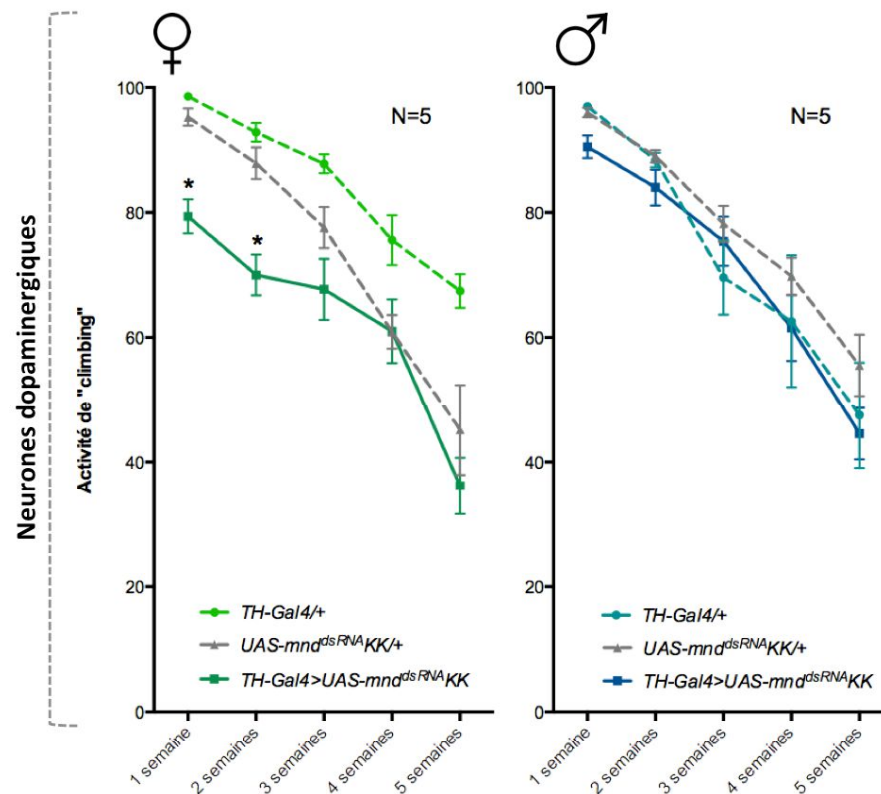
Marquages réalisés sur cerveaux *in toto* de drosophiles c305a-Gal4>UAS-mCD8GFP adultes avec des anticorps anti-GFP (vert) au niveau de la partie antérieure (A) et postérieure (B) du cerveau; MB : Corps Pédonculés ; AL : Lobes Antennaires ; SOG : Ganglion sous-œsophagien ; CC : Complexe Central.

Le complexe central est une structure nerveuse également connue pour être impliquée dans le réflexe de géotaxie négative (Strauss et Heisenberg, 1993). D'autres expériences devront être réalisées pour savoir si le rôle de *mnd* sur le « climbing » est dû à son expression dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés ou dans le complexe central (Figure 72).

Les neurones dopaminergiques sont un autre sous-ensemble de cellules connues pour être aussi impliquées dans le réflexe de géotaxie négative. Tandis que les travaux de Riemensperger et collaborateurs montrent que seuls les neurones dopaminergiques du groupe PAM semblent être impliqués dans ce réflexe, d'autres travaux incriminent d'avantage de groupes de neurones dopaminergiques dans ce comportement (Barone et Bohmann, 2013; Riemensperger *et al.*, 2013).

Les expériences d'immunohistologie indiquent que *mnd* est exprimé dans plusieurs groupes de neurones dopaminergiques, mais pas dans le groupe PAM (Figure 58 et Figure 59B). Afin de savoir si l'expression de *mnd* dans les neurones dopaminergiques pouvait être impliquée dans le réflexe de géotaxie négative, des tests de « climbing » ont été réalisés sur des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans ces neurones en utilisant la

séquence régulatrice TH. Ces tests n'ont pas permis d'observer de diminution significative de l'activité de « climbing », sauf pour les femelles mutantes en comparaison aux deux lignées témoins (Gal4/+ et UAS/+) lors des deux premières semaines de tests (Figure 74). Ces tests seront donc également à reproduire afin de savoir si le phénotype observé pour les femelles de 1 et 2 semaines est reproductible ou s'il est dû à un problème de fond génétique de la lignée TH-Gal4 qui n'avait pas encore été rétrocroisée avec la lignée  $w^{1118}$ .



**Figure 74 : Effet de la diminution du niveau d'expression de *mnd* dans les neurones dopaminergiques sur l'activité de « climbing » des drosophiles**

Tests de « climbing » réalisés sur des drosophiles témoins ( $w^{1118}$ ; TH-Gal4/+; UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK/+) et mutantes (TH-Gal4>UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK) âgées de 1 à 5 semaines. Tests statistiques : two-way ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey; significativité : \* =  $p < 0,05$  (la significativité statistique n'est annotée sur les graphes que lorsque les mutants sont différents des deux témoins Gal4/+ et UAS/+); N = nombre de réplicats.

#### f) Discussion et perspectives

Dans un premier temps, le rôle de Mnd dans le système nerveux a été étudié dans les types cellulaires ciblés par les séquences régulatrices de *mnd* 24-1 (neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés) et 25-1 (glie corticale). L'expression de *mnd* a été perturbée dans ces types cellulaires par interférence à ARN. Des expériences de qPCR ont permis de vérifier que l'expression d'ARNi dans les neurones des corps pédonculés et dans les cellules gliales du cortex provoque bien une diminution de la quantité de transcrits de *mnd* dans les têtes de drosophiles (Figure 61). Pour les cellules de Kenyon, les expériences

d'immunohistologie montrent que cette diminution de la quantité de transcrits de *mnd* entraîne bien une diminution de la quantité de protéines de Mnd (Figure 53).

Une des façons d'étudier le rôle d'une protéine dans le système nerveux est d'observer si la dérégulation de son expression entraîne un changement comportemental. Le type de comportement modifié peut alors donner des indications sur le rôle de cette protéine dans le système nerveux.

Afin de savoir si l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (séquence 24-1) et dans les cellules gliales du cortex (séquence 25-1) est impliquée dans l'un des comportements connus pour être associés à ces types cellulaires, différents paradigmes comportementaux ont été utilisés. Compte tenu de son profil d'expression, *mnd* pourrait par exemple être impliqué dans la perception olfactive, l'apprentissage et la mémoire, l'activité locomotrice ou encore le réflexe de géotaxie négative. Ces expériences n'ont pas permis de montrer d'implication de Mnd dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés ou dans la glie corticale dans l'un des comportements testés, bien que certains tests doivent être reproduits pour le confirmer.

En effet, lors des tests d'apprentissage olfactif aversif, des différences significatives avaient pu être observées entre géotypes mutants et témoins pour la première série de tests mais pas pour la seconde (Figure 67 et Figure 68). Ces résultats contradictoires pourraient être dus à une dérive des fonds génétiques entre les deux séries de tests. En effet, selon le contexte génétique, l'effet de la diminution de l'expression de *mnd* sur certains phénotypes comportementaux pourrait être masqué, ce qui suggérerait l'existence de mécanismes de compensation. Si c'est le cas, l'exploration de tels mécanismes apporterait de nouvelles indications sur le rôle des transporteurs d'acides aminés dans le système nerveux. Une troisième série de tests sera réalisée après de nouveaux rétrocroisements pour savoir quels résultats peuvent être reproduits et si la présence de Mnd dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés joue un rôle dans la mémorisation.

De plus, lors des tests de choix olfactif, la différence de participation entre les différentes lignées avait mené à l'observation de différences significatives entre géotypes mutants et témoins (Figure 63). Ces différences ne pouvant pas être expliquées par un défaut olfactif général (Figure 66) ou locomoteur (Figure 62) des drosophiles mutantes, d'autres tests comportementaux pourront être réalisés pour en déterminer l'origine. Cette différence de

comportement pourrait par exemple être liée à une baisse de la motivation des drosophiles pour la recherche de nourriture.

Le rôle de *Mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans la glie corticale devra être étudié sur d'autres comportements dans lesquels ces types cellulaires sont connus pour être impliqués, tels que la parade ou le sommeil (Bushey et Cirelli, 2011; Mehren *et al.*, 2004; Zwarts *et al.*, 2014). Par ailleurs, il serait intéressant de tester d'autres formes de mémoire olfactive comme la mémoire à long terme, puisque les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et les cellules gliales entourant les corps pédonculés sont connus pour leur rôle dans cette forme de mémoire (Güven-Ozkan et Davis, 2014; Matsuno *et al.*, 2015). Ces tests permettraient de savoir si l'expression de *mnd* dans une structure cérébrale est liée à un rôle sur un comportement spécifique plutôt qu'à une perturbation générale de l'activité nerveuse de cette structure.

Les expériences d'immunohistologie indiquent que l'expression de *mnd* n'est pas limitée aux cellules ciblées par les séquences régulatrices 24-1 et 25-1. Les marquages réalisés sur des cerveaux de drosophiles *c305a-Gal4>UAS-mCD8GFP* (Figure 56A) et *TH-Gal4>UAS-mCD8GFP* (Figure 58 A et B) montrent que *mnd* est également exprimé dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés ainsi que dans certains groupes de neurones dopaminergiques. De nouveaux marquages devront être réalisés pour déterminer quels sont les autres types de neurones et de cellules gliales dans lesquels *Mnd* est présent. En fonction des autres structures nerveuses identifiées, de nouveaux types de tests comportementaux pourront être envisagés.

Les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés et les neurones dopaminergiques sont connus pour leur rôle dans la mémorisation. Les tests d'apprentissage et de mémoire déjà entrepris avec les lignées 24-1-Gal4 et 25-1-Gal4 pourraient être poursuivis en utilisant les lignées *c305a-Gal4* et *TH-Gal4* pour perturber l'expression de *mnd*. Ces expériences permettraient de savoir si le rôle de *Mnd* sur un comportement tel que la mémorisation est spécifique d'un des types cellulaires associés à ce comportement. C'est dans cette optique que des tests ont été réalisés avec ces deux dernières lignées pour l'évaluation du réflexe de géotaxie négative (Figure 72 et Figure 74). Ces expériences semblent indiquer que l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés pourrait intervenir dans le réflexe de géotaxie négative des drosophiles (Figure 72). Ces tests devront être reproduits une fois les fonds génétiques des lignées *c305a-Gal4* et *TH-Gal4* isogénéisés. Les marquages réalisés sur des cerveaux de drosophiles *c305a-Gal4>UAS-mCD8GFP* ont montré que la séquence *c305a* permet

l'expression de la GFP dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés mais aussi dans le complexe central, également connu pour être impliqué dans le réflexe de géotaxie négative (Strauss et Heisenberg, 1993). D'autres expériences seront réalisées pour savoir si le rôle de *mnd* sur le « climbing » est dû à son expression dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés ou dans le complexe central.

Des tests de « climbing » pourraient par exemple être réalisés sur des drosophiles sous-exprimant *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés en utilisant une autre lignée Gal4 ne s'exprimant pas dans le complexe central, telle que la lignée G0050-Gal4 (Wang *et al.*, 2008). L'obtention d'une diminution de l'activité de « climbing » pour les drosophiles mutantes avec cette lignée confirmerait l'implication des lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés dans le phénotype observé.

Une lignée MB-Gal80 en combinaison avec les lignées c305a-Gal4 et UAS-*mnd*<sup>dsRNA</sup>KK pourrait également être utilisée. L'expression de Gal80 (inhibiteur de Gal4) dans les corps pédonculés (MB) permettrait d'obtenir des drosophiles ne présentant une diminution de l'expression de *mnd* que dans le complexe central sous la dépendance de la séquence c305a. Si une diminution de l'activité de « climbing » est toujours observée pour les drosophiles mutantes, alors ces résultats indiqueraient que le complexe central est impliqué dans le phénotype observé.

Ces tests comportementaux indiquent que la présence de Mnd dans certaines structures du système nerveux central intervient dans la modulation de certains comportements, tels que le réflexe de géotaxie négative pour les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés. Ces résultats suggèrent que Mnd pourrait donc être impliqué dans la régulation de l'activité neuronale. Toutefois, cette implication semble être spécifique de quelques comportements puisque la diminution de l'expression de *mnd* dans une structure nerveuse ne perturbe pas de façon drastique tous les comportements dans lesquels cette structure joue un rôle.

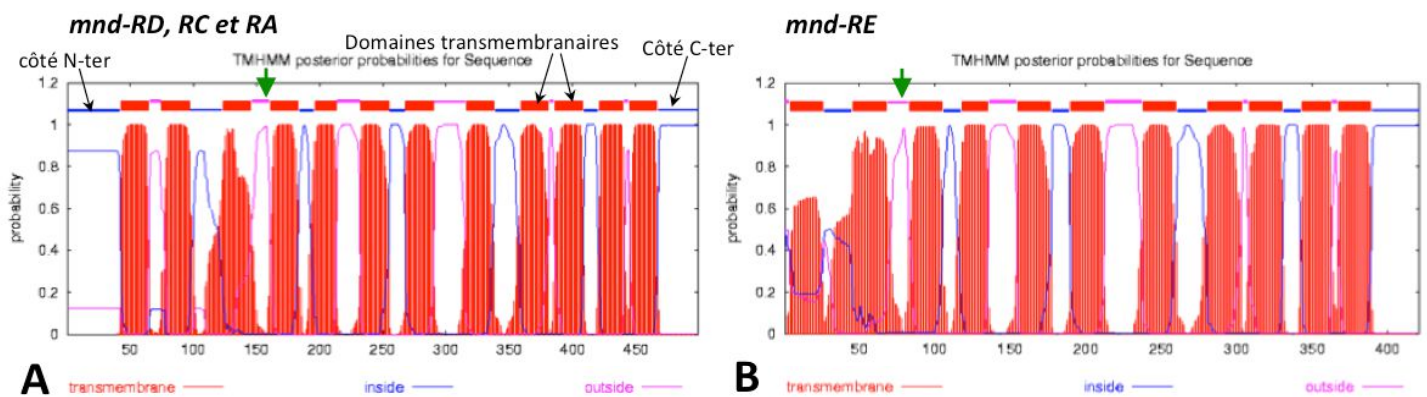
Certains des acides aminés transportés par Mnd pourraient être à l'origine de son rôle dans le fonctionnement cérébral. La spécificité de substrat de Mnd devra donc être étudiée afin de comprendre comment Mnd peut intervenir dans le cerveau. Pour pouvoir mettre en place ce type d'expérience, la conformation et les partenaires protéiques de Mnd ont tout d'abord été étudiés afin de mieux appréhender le fonctionnement de Mnd au niveau moléculaire.

### Partie 3 : Conformation et partenaires protéiques de Minidiscs

La conformation de Mnd a tout d'abord été étudiée pour savoir si elle correspond à la structure des chaînes légères de transporteurs HAT de mammifères. Puis dans un second temps, une recherche des différents partenaires protéiques de Mnd a été réalisée afin de savoir si, comme chez les mammifères, Mnd pouvait être associé à une chaîne lourde.

#### a) Étude de la conformation de Minidiscs

Comme vu précédemment, l'existence de deux isoformes de Mnd différant l'une de l'autre par leur côté N-ter est suspectée, les transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* permettraient la synthèse de l'une de ces isoformes et le transcrit *mnd-RE* celle de l'autre isoforme (cf. Partie 1-a.1 des résultats ; Figure 35). Les séquences protéiques des deux isoformes de Mnd disponibles sur « flybase » ont été analysées par le logiciel de prédiction de domaines transmembranaires TMHMM (Figure 75).



#### Figure 75 : Prédiction des domaines transmembranaires des deux isoformes de Minidiscs

L'isoforme correspondant aux transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* comporte 12 domaines transmembranaires (A) tandis que l'isoforme correspondant au transcrit *mnd-RE* en comporte 11 (B). Les domaines transmembranaires sont schématisés en rouge, les domaines intracellulaires en bleu et les domaines extracellulaires en rose. La position de la cystéine conservée avec les chaînes légères de mammifères et étant impliquée dans la liaison avec la chaîne lourde est signalée par une flèche verte (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Cette analyse indique que l'isoforme correspondant aux transcrits *RD*, *RC* et *RA* posséderait 12 domaines transmembranaires (schématisés en rouge), un côté N-ter intracellulaire de 42 acides aminés et un côté C-ter intracellulaire de 32 acides aminés (Figure 75A). Cette conformation correspond à la structure décrite pour les chaînes légères de mammifères (Figure 4 ; Verrey *et al.*, 2004). Comme chez les mammifères, une cystéine est présente au niveau de la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire (flèche verte ; Figure 75A) et pourrait être impliquée dans la formation d'un pont disulfure permettant la liaison de Mnd avec une chaîne lourde. L'isoforme correspondant au transcrit *RE* posséderait quant à elle 11 domaines transmembranaires, un côté N-ter extracellulaire de seulement 3 acides



aminés et un côté C-ter intracellulaire de 32 acides aminés (Figure 75B). Une cystéine pouvant permettre la formation d'un pont disulfure avec une chaîne lourde est présente au niveau de la 1<sup>ère</sup> boucle extracellulaire (flèche verte ; Figure 75B). Ces isoformes ont respectivement un poids moléculaire de 54,3 kDa (*RD*, *RC* et *RA*) et 46,4 kDa (*RE*).

## b) Recherche des différents partenaires protéiques de Minidiscs

### b.1) Recherche par bioinformatique

Afin d'identifier la chaîne lourde s'associant à Mnd et permettant la formation d'un transporteur fonctionnel, une recherche bioinformatique a été réalisée. Deux approches ont été utilisées pour cette recherche afin d'identifier différentes chaînes lourdes potentielles de Mnd :

- par similarité de séquence avec les chaînes lourdes de mammifères connues (rBAT et CD98hc ; Palacín *et al.*, 2005) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),
- en interrogeant les bases de données d'interaction protéine-protéine BioGRID (<http://thebiogrid.org/>) et DroID (<http://www.droidb.org/>).

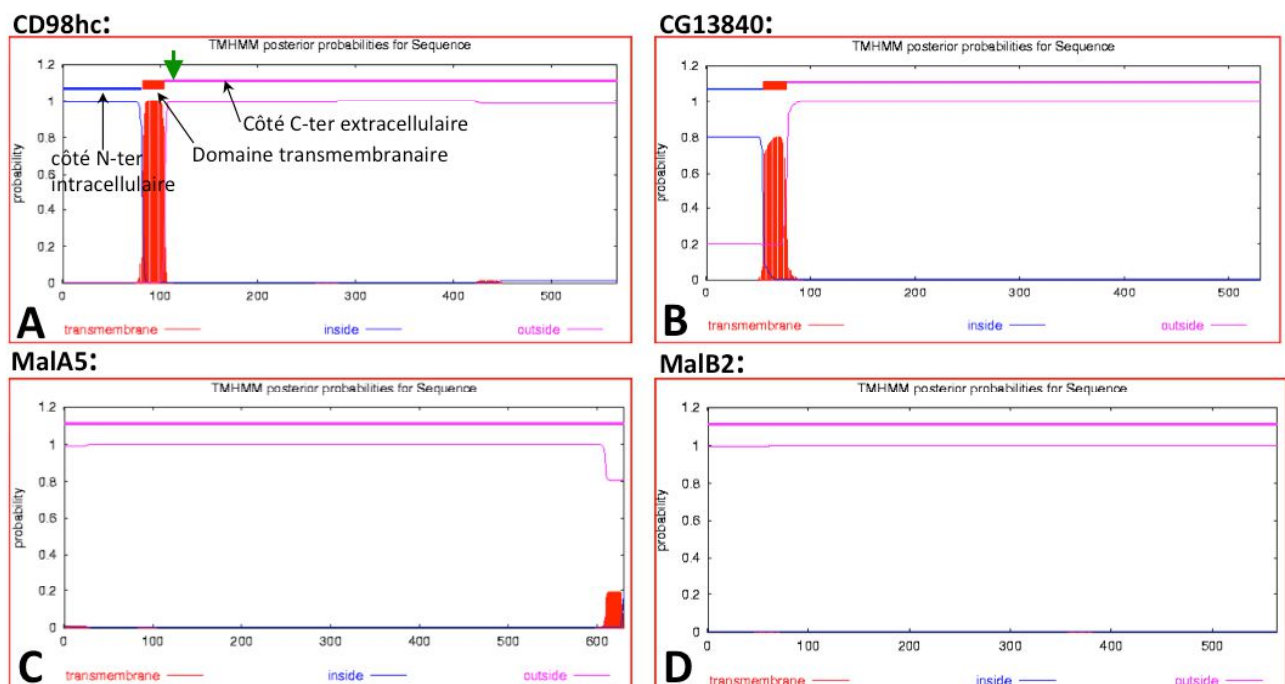
La recherche par similarité de séquences a permis d'identifier la protéine CD98hc (déjà décrite par Reynolds *et al.*, 2009) (29 % d'identité de séquence avec la protéine CD98hc humaine) ainsi que les protéines Maltases Mal A1 à Mal A8, Mal B1 et MalB2 (30 à 42 % d'identité de séquence avec la protéine CD98hc humaine). D'après les données d'expression tissulaire disponibles sur « flybase », seules les protéines CD98hc, Mal A5 et Mal B2 semblent être exprimées dans le système nerveux central des drosophiles adultes. Les autres Maltases semblent être pour la plupart majoritairement exprimées dans le système digestif.

CD98hc est la protéine qui paraît être la plus proche des chaînes lourdes de mammifères aussi bien au niveau de sa séquence que de sa structure tertiaire (Figure 76A). En effet, comme chez les mammifères (Figure 4 ; Verrey *et al.*, 2004), cette protéine est composée d'une extrémité N-ter intracellulaire courte, d'un domaine transmembranaire et d'une extrémité C-ter extracellulaire comprenant une cystéine conservée importante pour la formation d'un pont disulfure avec une chaîne légère (flèche verte ; Figure 76A). Cependant, les expériences conduites par Reynolds et collaborateurs n'ont pas permis de mettre en évidence la formation d'un complexe fonctionnel entre Mnd et CD98hc en culture cellulaire alors que cela a pu être démontrée pour JhI-21 et CD98hc (Reynolds *et al.*, 2009).

Les protéines Mal A5 et Mal B2 possèdent une similarité de séquence importante avec les chaînes lourdes de mammifères mais présentent une structure tertiaire différente. En

effet, les maltases ne semblent pas posséder de domaine transmembranaire d'après le programme de prédiction de domaine transmembranaire TMHMM (Figure 76C et Figure 76D). Pour cette raison, les maltases avaient été exclues de la recherche d'orthologues de la protéine CD98hc humaine chez la drosophile menée par Prager et collaborateurs (Prager *et al.*, 2007). Toutefois, ces protéines possèdent des cystéines dans leur séquence peptidique qui pourraient être impliquées dans la formation de ponts disulfures.

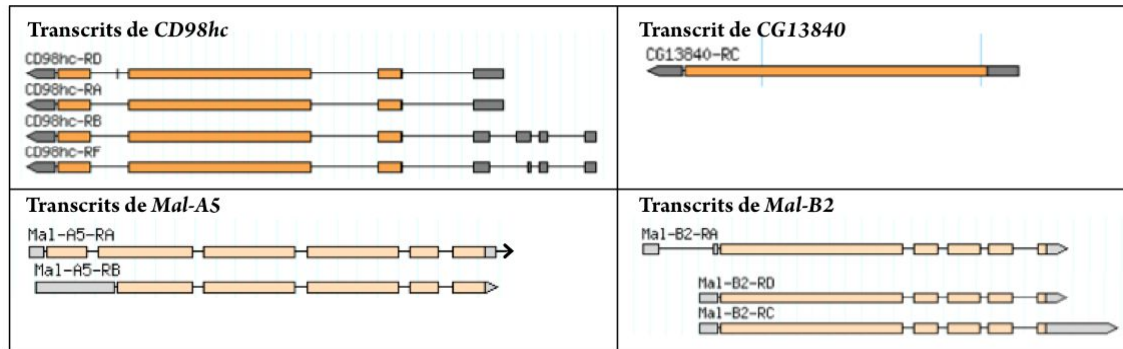
La recherche sur les bases de données d'interaction protéine-protéine a permis d'identifier plus d'une cinquantaine de protéines interagissant potentiellement avec Mnd. Seule la protéine CG13840 est ressortie lors de ce criblage car c'est la seule protéine possédant une structure tertiaire similaire aux chaînes lourdes de mammifères (extrémité N-ter intracellulaire courte, domaine transmembranaire et extrémité C-ter extracellulaire ; Figure 76B) et qui est exprimée dans le système nerveux central des drosophiles (selon les données d'expression tissulaire disponibles sur « flybase »). Cependant, la protéine CG13840 semble être spécifique des insectes car aucune identité de séquence n'a été trouvée avec des protéines de mammifères. De plus, cette protéine ne présente pas la cystéine conservée dans sa partie extracellulaire comme c'est le cas pour les chaînes lourdes de mammifères.



**Figure 76 : Prédiction des domaines transmembranaires des protéines CD98hc, CG13840, MalA5 et MalB2**

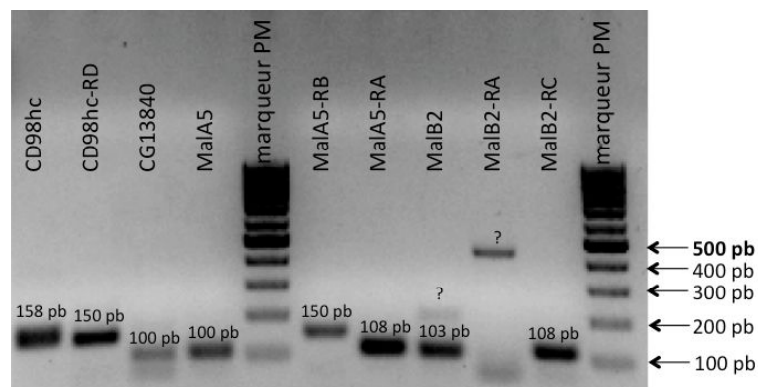
Les protéines CD98hc (A) et CG13840 (B) comportent 1 domaine transmembranaire tandis que les protéines MalA5 (C) et MalB2 (D) n'en comportent pas. Les domaines transmembranaires sont schématisés en rouge, les domaines intracellulaires en bleu et les domaines extracellulaires en rose. La position de la cystéine conservée pour CD98hc avec les chaînes lourdes de mammifères est signalée par une flèche verte (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

L'expression des différents transcrits de *CD98hc*, *CG13840*, *Mal A5* et *Mal B2* (Figure 77) dans le système nerveux a ensuite été vérifiée par RT-PCR à partir d'ADNc de têtes de drosophiles *w<sup>1118</sup>* âgées de 4 à 9 jours en utilisant des couples d'amorces spécifiques de chacun de ces transcrits (*cf.* Partie 3-d du matériel et méthodes, Tableau XXVII) (Figure 78).



**Figure 77 : Représentation schématique des différents transcrits de *CD98hc*, *CG13840*, *Mal A5* et *Mal B2***

Les parties non traduites des différents transcrits sont représentées en gris et les parties traduites en orange et orange clair ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).



**Figure 78 : Mise en évidence de l'expression des différents transcrits de *CD98hc*, *CG13840*, *Mal A5* et *Mal B2* dans les têtes de drosophiles adultes**

Séparation électrophorétique des produits de RT-PCR obtenus à partir d'ADNc de têtes de drosophiles *w<sup>1118</sup>*. Une amplification de la taille attendue est obtenue pour chacun des transcrits de *CD98hc*, *CG13840*, *Mal A5* et *Mal B2* mise à part pour *Mal B2-RA* (taille attendue de l'amplicon de 100 pb) ; PM : Poids Moléculaire.

Les différents couples d'amorces ont permis d'obtenir des amplicons dont la taille correspond à celle attendue, sauf pour le transcrit *Mal B2-RA* pour lequel un amplicon de taille supérieure à la taille attendue a été obtenu, ce qui pourrait s'expliquer par un problème de spécificité des amorces utilisées pour amplifier ce transcrit.

Par ailleurs, l'existence du transcrit *CD98hc-RD* a été vérifiée par séquençage en plus d'avoir été prouvée par RT-PCR. Ce transcrit ne diffère que de six nucléotides des autres transcrits de *CD98hc* (dans la partie codante) et devrait mener à la synthèse d'une isoforme

de CD98hc comportant 2 acides aminés supplémentaires dans la partie C-ter par rapport à l'isoforme correspondant aux autres transcrits de *CD98hc*.

D'autre part, les bases de données d'interaction protéine-protéine indiquent que les différentes chaînes légères de drosophiles (Gb, JhI-21, Mnd, CG9413 et CG1607) interagissent toutes les unes avec les autres, ce qui suggère l'existence de complexes protéiques potentiellement différents des hétérodimères chaîne lourde/chaîne légère décrits chez les mammifères.

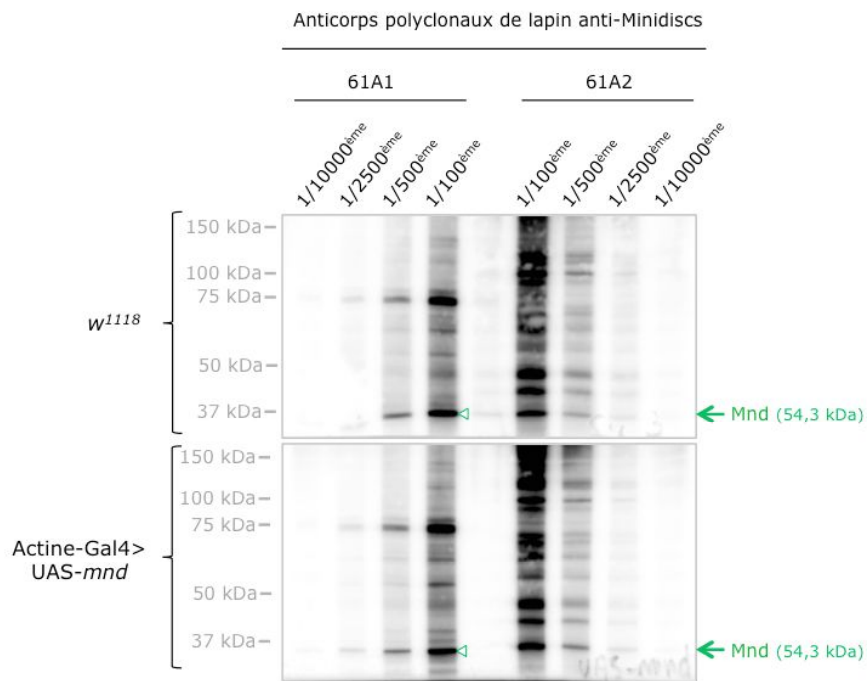
### *b.2) Mises au point pour les expériences de co-immunoprécipitation*

La co-immunoprécipitation est une méthode *in vitro* permettant de mettre en évidence des partenaires putatifs de Mnd. Les partenaires mis en évidence par cette technique peuvent alors être comparés à la liste de chaînes lourdes potentielles identifiées par bioinformatique. Si des protéines sont identifiées par ces deux approches, alors celles-ci sont de bonnes candidates pour la recherche de la chaîne lourde ou de partenaires protéiques de Mnd. L'ensemble des expériences concernant les co-immunoprécipitations et leurs mises au point ont été réalisées conjointement avec Flore Geillon (post-doctorante de l'équipe 14 du CSGA).

Des anticorps reconnaissant spécifiquement et uniquement Mnd sont nécessaires à la réalisation de cette technique. Des Western Blot ont donc été réalisés sur des lysats de drosophiles témoins (*w<sup>1118</sup>*) et sur-exprimant *mnd* (Actine-Gal4>UAS-*mnd*) afin d'estimer la spécificité et la sensibilité des anticorps anti-Mnd 61A1 et 61A2 en conditions dénaturantes (Figure 79).

Comme cela a été observé pour les chaînes légères de mammifères par Fernández et collaborateurs, la bande correspondant à Mnd apparaît aux environs de 37 kDa pour une taille attendue de 54,3 kDa (Fernández *et al.*, 2002). Cette bande à 37 kDa est observable avec les deux lots d'anticorps anti-Mnd pour toutes les dilutions testées. En effet, les 12 domaines transmembranaires de Mnd rendent cette protéine hautement hydrophobe, ce qui entraîne une vitesse de migration plus élevée dans un gel d'acrylamide en présence de SDS et donc une taille apparente plus petite. Le plus faible nombre de bandes aspécifiques obtenues avec l'anticorps anti-Mnd 61A1 indique que celui-ci est plus spécifique que 61A2 en conditions dénaturantes. C'est donc cet anticorps qui sera utilisé par la suite en Western Blot. Cependant, quelque soit l'anticorps considéré, aucune augmentation notable du signal n'est observable pour le lysat de drosophiles sur-exprimant *mnd* en comparaison du signal obtenu pour les drosophiles témoins. Ce résultat suggère que les anticorps anti-Mnd ne

sont pas suffisamment sensibles en conditions dénaturantes pour permettre de visualiser les différences de quantité de Mnd.

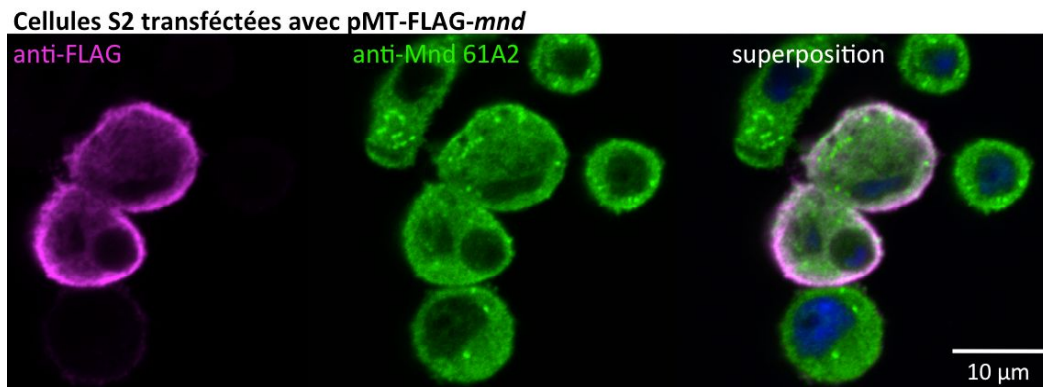


**Figure 79 : Test des anticorps anti-Mnd 61A1 et 61A2 à différentes dilutions en Western Blot sur des lysats de drosophiles témoins ( $w^{1118}$ ) et sur-exprimant *mnd* (Actine-Gal4>UAS-*mnd*)**

Des lysats protéiques (préparés avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol) obtenus à partir de drosophiles  $w^{1118}$  ou Actine-Gal4>UAS-*mnd* ont été déposés sur gel, séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane et révélés avec des anticorps anti-Mnd 61A1 ou 61A2 à différentes dilutions. Le caractère très hydrophobe de Mnd dû à ses 12 domaines transmembranaires induit une vitesse de migration plus élevée dans un gel d'acrylamide en présence de SDS et fait apparaître la bande correspondant à Mnd vers 37 kDa (taille attendue 54,3 kDa).

Toutefois, aucun de ces deux anticorps n'est suffisamment spécifique en conditions dénaturantes pour être utilisé lors d'expériences de co-immunoprécipitations. Pour pallier ce problème, des plasmides permettant la sur-expression dans des cellules S2 de drosophiles de Mnd tagué par le peptide FLAG en N-ter ont été créés (cf. Partie 2-c.2 du matériel et méthodes). Des anticorps anti-FLAG peuvent donc être utilisés à la place des anticorps anti-Mnd lors des co-immunoprécipitations.

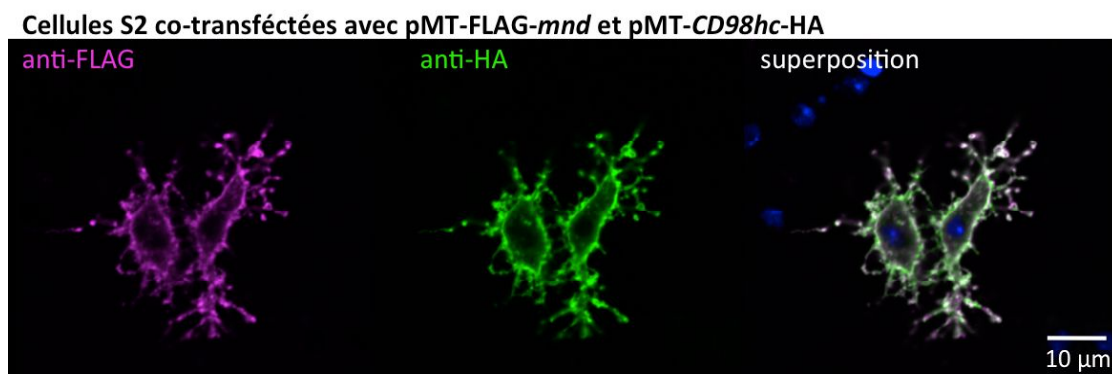
Des marquages sur des cellules transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* ont été réalisés avec des anticorps anti-Mnd 61A2 (utilisés précédemment en immunohistologie ; cf. Partie 1 des résultats) et des anticorps anti-FLAG afin de visualiser l'effet de cette transfection (**Figure 80**). Le marquage obtenu avec l'anticorps anti-FLAG est bien membranaire alors que le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Mnd 61A2 est ponctué à l'intérieur des cellules. De plus, aucune augmentation du signal de l'anticorps anti-Mnd 61A2 n'est observable pour les cellules ayant intégré le plasmide pMT-FLAG-*mnd* lors de la transfection (cellules marquées par l'anticorps anti-FLAG). Ces résultats suggèrent que l'anticorps anti-Mnd ne semble pas être spécifique de Mnd en immunocytochimie.



**Figure 80 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-FLAG et anti-Mnd 61A2 sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant FLAG-*mnd***

Doubles marquages réalisés sur cellules S2 de drosophiles transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* avec des anticorps anti-FLAG (magenta) et anti-Mnd 61A2 (vert); les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (bleu); les cellules marquées avec l'anticorps anti-FLAG sont les cellules ayant intégré le plasmide pMT-FLAG-*mnd* lors de la transfection.

D'autre part, CD98hc étant le meilleur candidat de chaîne lourde pour Mnd identifié par bioinformatique, des plasmides permettant la sur-expression de CD98hc tagué par le peptide HA en C-ter ont également été créés. Des marquages sur des cellules co-transfectées avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA ont été réalisés afin de visualiser l'effet de cette co-transfection (Figure 81).

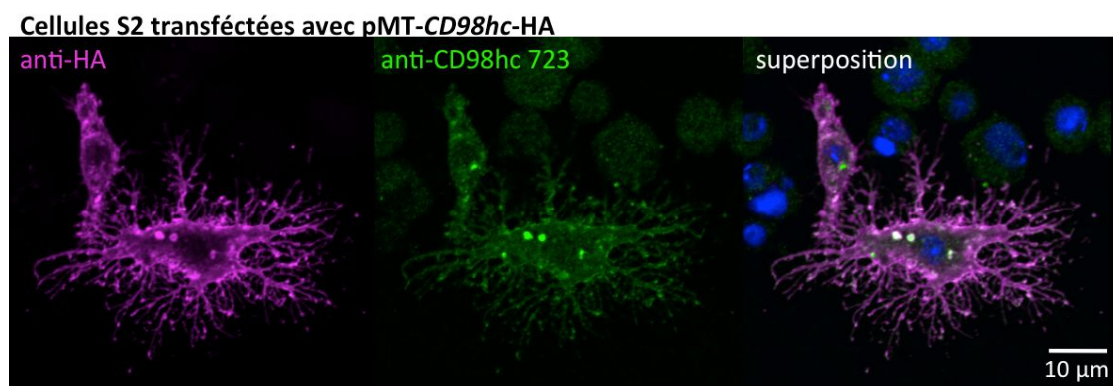


**Figure 81 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-FLAG et anti-HA sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant FLAG-*mnd* et CD98hc-HA**

Doubles marquages réalisés sur cellules S2 de drosophiles co-transfectées avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA avec des anticorps anti-FLAG (magenta) et anti-HA (vert); les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (bleu); les cellules marquées avec les anticorps anti-FLAG et anti-HA sont les cellules ayant intégré les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA lors de la co-transfection.

Un changement de morphologie des cellules co-transfectées peut être observé pour les cellules ayant intégré les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA lors de la co-transfection. En effet, ces cellules présentent des extensions cytoplasmiques semblables à des filopodes. Par ailleurs, une très bonne superposition entre le signal de l'anticorps anti-FLAG et de l'anticorps anti-HA est observable. Cette superposition ne prouve pas que Mnd et CD98hc interagissent ensemble mais montre que ces deux protéines se répartissent

toutes les deux sur l'ensemble de la membrane plasmique des cellules. Afin de savoir si le changement de morphologie observé pourrait être dû à l'association de Mnd et CD98hc, des marquages sur des cellules transfectées avec le plasmide pMT-*CD98hc*-HA seul ont été réalisés (Figure 82).



**Figure 82 : Comparaison des marquages obtenus avec les anticorps anti-HA et anti-CD98hc 723 sur cellules S2 de drosophiles sur-exprimant *CD98hc*-HA**

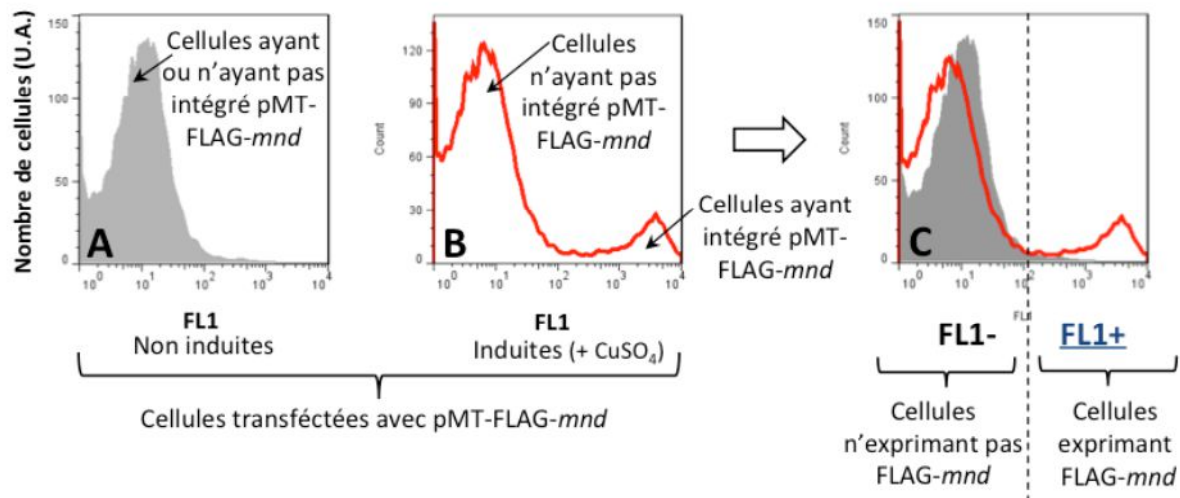
Doubles marquages réalisés sur cellules S2 de drosophiles transfectées avec le plasmide pMT-*CD98hc*-HA avec des anticorps anti-HA (magenta) et anti-CD98hc 723 (vert); les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (bleu); les cellules marquées avec l'anticorps anti-HA sont les cellules ayant intégré le plasmide pMT-*CD98hc*-HA lors de la transfection.

Ces marquages montrent que la sur-expression de CD98hc seule entraîne un changement de morphologie des cellules transfectées et ne semble donc pas impliquer Mnd. CD98hc est connu pour interagir avec le domaine intracellulaire de la sous-unité  $\beta$  des intégrines et cette interaction intervient dans le signal d'adhésion entre cellules ou entre cellule et matrice (Prager *et al.*, 2007). Cette propriété de CD98hc pourrait être à la base du changement de morphologie observé.

Afin d'évaluer la quantité de cellules ayant intégré les plasmides avec lesquels ces cellules sont transfectées, des expériences de cytométrie en flux ont été mises en place (Figure 83). Pour ces expériences, des cellules transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* ont été induites ou non avec du sulfate de cuivre. Le sulfate de cuivre induit la production de Mnd taguée avec FLAG dans les cellules ayant intégré le plasmide lors de la transfection.

L'analyse des cellules non induites par cytométrie en flux après les avoir marquées avec un anticorps anti-FLAG permet d'observer une population homogène de cellules n'exprimant pas FLAG-*mnd* (Figure 83A). Par contre, l'analyse des cellules induites permet d'observer deux populations de cellules homogènes différenciables par leur niveau de fluorescence (Figure 83B). Ces populations sont constituées d'une part par les cellules induites mais n'ayant pas intégré le plasmide pMT-FLAG-*mnd* lors de la transfection (FL1-) et d'autre part par les cellules induites ayant bien intégré le plasmide et exprimant FLAG-

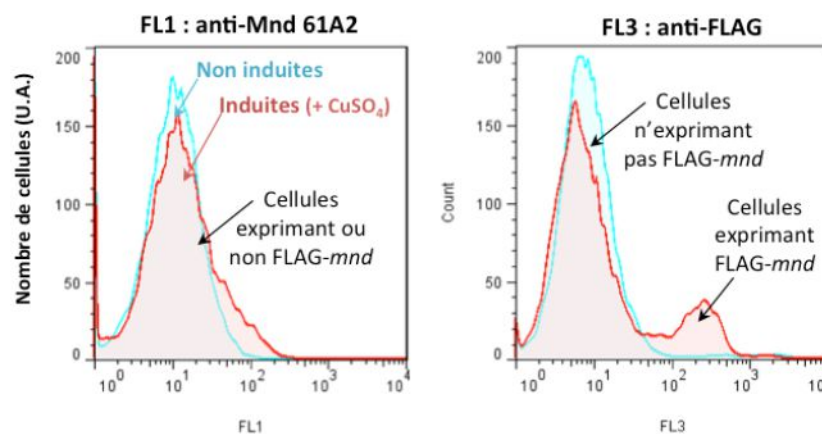
*mnd* (FL1+) (Figure 83C). Ces résultats montrent que l'anticorps anti-FLAG permet bien de distinguer ces deux populations de cellules par cytométrie en flux.



**Figure 83 : Résultats de cytométrie en flux pour des cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* non induites ou induites avec du sulfate de cuivre**

Des anticorps anti-FLAG (FL1) ont été utilisés pour le marquage des cellules transfectées; la superposition des graphiques permet de différencier deux populations de cellules : FL1- (cellules n'exprimant pas la protéine Mnd taguée) et FL1+ (cellules exprimant la protéine Mnd taguée).

Afin de savoir si l'anticorps anti-Mnd 61A2 peut permettre de différencier ces deux populations de cellules par cytométrie en flux, ces expériences ont été renouvelées en marquant les cellules avec des anticorps anti-Mnd 61A2 et anti-FLAG (Figure 84).



**Figure 84 : Résultats de cytométrie en flux pour des cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* non induites ou induites avec du sulfate de cuivre**

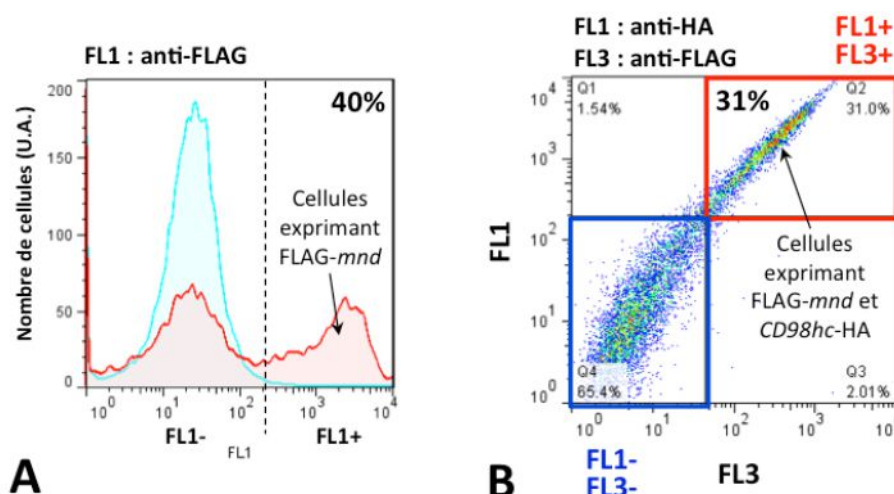
Des anticorps anti-Mnd 61A2 (FL1) et anti-FLAG (FL3) ont été utilisés pour le marquage des cellules transfectées; la courbe bleue correspond aux cellules non induites et la courbe rouge aux cellules induites avec du sulfate de cuivre.

Ces résultats indiquent que l'anticorps anti-Mnd 61A2 ne permet pas de distinguer les populations de cellules FL1- (n'exprimant pas FLAG-*mnd*) et FL1+ (exprimant FLAG-*mnd*) ce qui est cohérent avec l'absence d'augmentation du signal pour les cellules exprimant



FLAG-*mnd* constatée en immunocytologie (Figure 80). Seul l'anticorps anti-FLAG peut donc être utilisé pour identifier les cellules ayant intégré le plasmide pMT-FLAG-*mnd* lors des transfections (Figure 84).

L'analyse par cytométrie en flux permet de mettre en évidence la proportion de cellules exprimant FLAG-*mnd* après la transfection. Cette méthode a été utilisée pour identifier quelles étaient les meilleures conditions de transfection pour obtenir la plus grande proportion de cellules ayant bien intégré le plasmide. Ces ajustements ont porté sur la quantité de plasmides à utiliser pour les transfections et co-transfections, sur le ratio ADN : Fugène (agent de transfection) et sur le temps d'incubation du mix Fugène-ADN avant que celui-ci ne soit mis en contact avec les cellules. Les conditions de transfection permettant d'obtenir les meilleurs résultats sont détaillées dans le matériel et méthodes et ont été conservées pour la suite des expériences (*cf.* Partie 2-c.3 du matériel et méthodes). Dans ces conditions, 40% des cellules ont intégré le plasmide après transfection avec pMT-FLAG-*mnd* (Figure 85A) et 31 % des cellules ont intégré les deux plasmides après co-transfection avec pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA (Figure 85B).

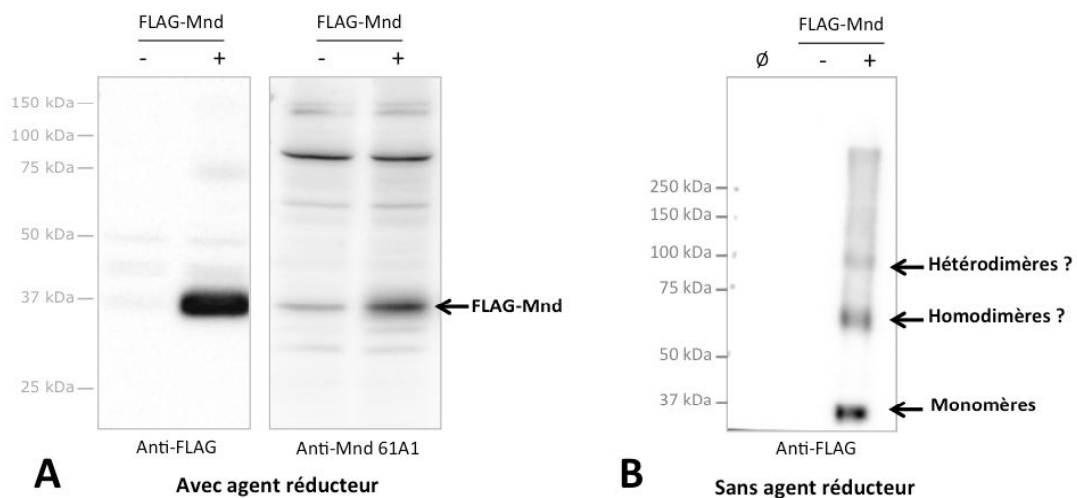


**Figure 85 : Quantification par cytométrie en flux des cellules S2 transformées après transfection avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* (A) ou co-transfection avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA (B)**

(A) Des anticorps anti-FLAG (FL1) ont été utilisés pour le marquage des cellules transfectées ; la courbe bleue correspond aux cellules non induites et la courbe aux cellules induites avec du sulfate de cuivre ; deux populations de cellules peuvent être distinguées dans le cas des cellules induites: FL1- (cellules n'exprimant pas FLAG-*mnd*) et FL1+ (cellules exprimant FLAG-*mnd*). (B) Des anticorps anti-HA (FL1) et anti-FLAG (FL3) ont été utilisés pour le marquage des cellules co-transfectées ; l'encadré bleu correspond aux cellules n'exprimant pas FLAG-*mnd* et CD98hc-HA (FL1- FL3-) et l'encadré rouge aux cellules exprimant FLAG-*mnd* et CD98hc-HA (FL1+ FL3+).

Des Western Blots ont ensuite été réalisés à partir de lysats de cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* induites ou non avec du sulfate de cuivre, afin d'estimer la

spécificité et la sensibilité de l'anticorps anti-FLAG en conditions dénaturantes (Figure 86A).



**Figure 86 : Test des anticorps anti-FLAG en Western Blot sur des lysats de cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* en présence (A) ou absence (B) d'agents réducteurs**

(A) Des lysats protéiques (préparés avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du DTT) de cellules transfectées par pMT-FLAG-*mnd* induites (+) ou non (-) par du sulfate de cuivre ont été déposés sur gel, séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane et révélés avec des anticorps anti-FLAG. La membrane a ensuite été « strippée », puis révélée à nouveau avec des anticorps anti-Mnd 61A1. (B) Des lysats protéiques (préparés sans agent réducteur) de cellules non transfectées ( $\emptyset$ ) ou transfectées par pMT-FLAG-*mnd* puis induites (+) ou non (-) par du sulfate de cuivre ont été déposés sur gel, séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane et révélés avec des anticorps anti-FLAG.

Le plus faible nombre de bandes aspécifiques obtenues avec l'anticorps anti-FLAG indique que celui-ci est effectivement plus spécifique que l'anticorps anti-Mnd 61A1 en conditions dénaturantes. De plus, l'augmentation du signal pour la bande correspondant à FLAG-Mnd pour les cellules induites (+) sur-exprimant FLAG-*mnd* en comparaison aux cellules non induites (-) est plus importante pour l'anticorps anti-FLAG que pour l'anticorps anti-Mnd 61A1. Ce résultat indique que l'anticorps anti-FLAG est plus sensible que l'anticorps anti-Mnd 61A1 (Figure 86A).

Chez les mammifères, l'association covalente entre chaîne légère et chaîne lourde s'établit via un pont disulfure (Verrey *et al.*, 2004). Afin de savoir si Mnd s'associe également de façon covalente à un ou des partenaires protéiques, des Western Blots ont été réalisés avec des lysats de cellules préparés sans agents réducteurs afin de ne pas rompre les ponts disulfures entre les protéines (Figure 86B). Aucun signal n'est observé dans les pistes correspondant aux lysats de cellules non transfectées ou transfectées par pMT-FLAG-*mnd* mais non induites. Ce résultat confirme que l'anticorps anti-FLAG est bien spécifique en conditions dénaturantes. Trois bandes (à environ 37 ; 70 et 100 kDa) sont observables sur la piste correspondant au lysat de cellules transfectées par pMT-FLAG-*mnd*

et induites avec du sulfate de cuivre. La bande présente à environ 37 kDa pourrait correspondre à la forme monomérique de FLAG-Mnd qui est la forme de Mnd observée pour les Western Blots réalisés en présence d'agents réducteurs. La forte proportion de la forme non complexée de Mnd, même en l'absence d'agent réducteur, pourrait s'expliquer par la sur-expression de cette chaîne légère qui n'est pas accompagnée de la sur-expression de ses partenaires protéiques. En effet, ces résultats ne sont pas représentatifs des proportions réelles des différentes formes de Mnd dans les cellules S2. La bande présente à environ 70 kDa (environ le double de 37 kDa) pourrait correspondre à l'homodimérisation de deux protéines FLAG-Mnd ou à la dimérisation de FLAG-Mnd avec l'une des autres chaînes légères homologues de Mnd, comme le suggère la recherche par bioinformatique (*cf.* Partie 3-b.1 des résultats). La bande à 100 kDa pourrait quant à elle correspondre à l'hétérodimérisation de FLAG-Mnd avec une chaîne lourde par exemple.

À titre indicatif, la taille attendue du complexe Mnd-CD98hc serait de 117 kDa (54,3 kDa pour Mnd et 62,7 kDa pour CD98hc; estimation du poids moléculaire d'après <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>).

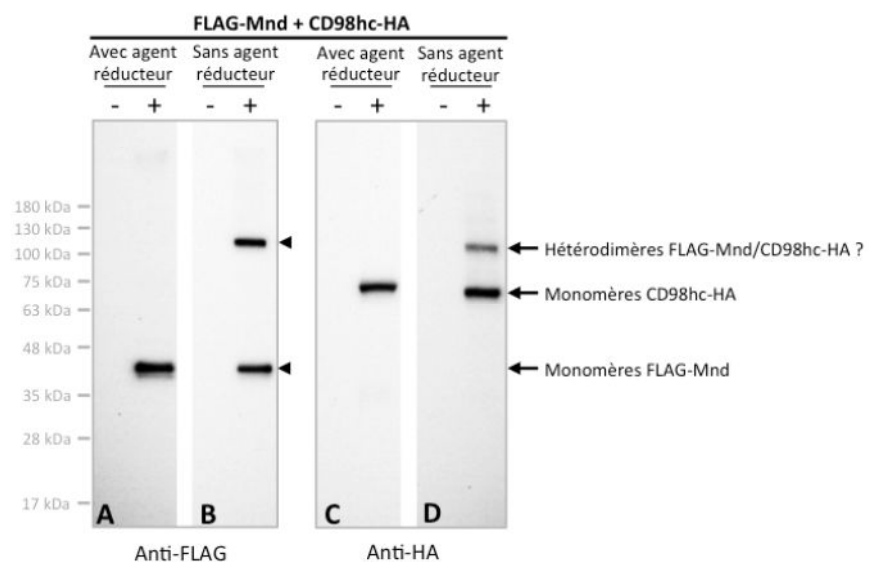
Afin de savoir si Mnd peut s'associer de façon covalente avec CD98hc, des Western Blots ont été réalisés avec des lysats de cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* et CD98hc-HA préparés avec ou sans agents réducteurs (Figure 87). Aucun signal n'est observé dans les pistes correspondant aux lysats de cellules transfectées mais non induites. Ce résultat indique que, comme l'anticorps anti-FLAG, l'anticorps anti-HA est bien spécifique en conditions dénaturantes.

En présence d'agent réducteur, la rupture des ponts disulfures entraîne la dissociation des complexes protéiques. Dans ces conditions, la révélation avec l'anticorps anti-FLAG permet d'observer une bande à environ 37 kDa correspondant à FLAG-Mnd (Figure 87A) et la révélation avec l'anticorps anti-HA permet d'observer une bande à environ 75 kDa correspondant à CD98hc-HA (Figure 87C).

En l'absence d'agents réducteurs, les protéines associées de façon covalente par un pont disulfure restent sous forme de complexe. Dans ces conditions, la révélation de FLAG-Mnd avec l'anticorps anti-FLAG permet d'observer deux bandes à environ 37 et 100 kDa (Figure 87B), mais pas de bande à environ 70 kDa comme pour la sur-expression de FLAG-*mnd* seul (Figure 86B). La bande à environ 37 kDa correspond probablement à la forme monomérique de FLAG-Mnd et la bande à 100 kDa pourrait correspondre à l'hétérodimérisation de FLAG-Mnd avec une chaîne lourde. Ces résultats suggèrent que la surexpression de FLAG-*mnd* avec CD98hc-HA empêche la formation d'homodimères FLAG-

Mnd (ou de dimères entre FLAG-Mnd et une autre chaîne légère). La formation d'homodimères pourrait alors résulter de la sur-expression de FLAG-*mnd* seul sans sur-expression de ses partenaires protéiques (Figure 86B). La révélation de CD98hc-HA avec l'anticorps anti-HA permet quant à elle d'observer deux bandes à environ 75 et 100 kDa (Figure 87D). La bande à environ 75 kDa correspond probablement à la forme monomérique de CD98hc-HA et la bande à 100 kDa pourrait correspondre à l'hétérodimérisation de CD98hc-HA avec une chaîne légère.

La bande à 100 kDa révélée aussi bien avec l'anticorps anti-FLAG (Mnd) qu'avec l'anticorps anti-HA (CD98hc) pourrait correspondre à la formation d'hétérodimères FLAG-Mnd/CD98hc-HA. Par ailleurs, la présence de la forme monomérique de FLAG-Mnd (bande à 37 kDa) et de CD98hc-HA Mnd (bande à 75 kDa) en l'absence d'agent réducteur indique que toutes les protéines FLAG-Mnd et CD98hc-HA ne s'hétérodimérisent pas entre elles dans ces conditions (Figure 87 B et D).



**Figure 87 : Test des anticorps anti-FLAG et anti-HA en Western Blot sur des lysats de cellules S2 co-transfectées avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA en présence ou absence d'agents réducteurs**

Des lysats protéiques (préparés avec (A et C) ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol et DTT (B et D)) de cellules co-transfectées par pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA induites (+) ou non (-) par du sulfate de cuivre ont été déposés sur gel, séparés par SDS-PAGE, transférés sur membrane et révélés avec des anticorps anti-FLAG (A et B) ou des anticorps anti-HA (C et D).

Les résultats obtenus en l'absence d'agent réducteur avec des cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* indiquent que, comme chez les mammifères, Mnd forme bien des complexes avec des partenaires protéiques au moyen d'un pont disulfure (Figure 86B). Les résultats obtenus en l'absence d'agent réducteur à partir de cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* et

*CD98hc*-HA semblent indiquer que Mnd s'hétérodimérise avec *CD98hc* dans ces conditions spécifiques (Figure 87 B et D).

### c) Discussion et perspectives

La traduction des transcrits de *mnd* mène théoriquement à la synthèse de deux isoformes de Mnd. La conformation prédite de l'isoforme correspondant aux transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* (Figure 75A) est conforme à celle décrite pour les chaînes légères HAT de mammifères (Verrey *et al.*, 2004). Bien que l'existence du transcrit *mnd-RE* ait été confirmée par RT-PCR (Figure 37), rien ne prouve l'existence de son isoforme protéique. L'isoforme protéique de *mnd-RD*, *RC* et *RA* est constituée de 499 acides aminés contre 421 pour l'isoforme protéique de *mnd-RE*. Ces isoformes diffèrent par leur région N-ter, les 400 acides aminés du côté C-ter étant identiques entre les deux isoformes. La séquence peptidique sélectionnée pour la création des anticorps anti-Mnd 61A1 et 61A2 (côté C-ter) est commune aux deux isoformes putatives de Mnd (Figure 30). La création de nouveaux anticorps à partir de séquences peptidiques spécifiques de chacune de ces isoformes permettrait de les localiser dans le cerveau de drosophile. Cette technique pourrait permettre de valider ou d'invalider l'existence de ces deux isoformes distinctes.

Les Western Blots réalisés à partir de cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* ont permis de confirmer la spécificité de l'anticorps anti-Mnd 61A1 en conditions dénaturantes (superposition du signal à 37 kDa ; Figure 86A). Le plasmide permettant la sur-expression de FLAG-*mnd* a été créé à partir d'un ADNc de *mnd* correspondant aux transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* (*cf.* Partie 2-c.2 du matériel et méthodes). La bande à 37 kDa correspond donc à l'isoforme de *mnd* possédant 12 domaines transmembranaires et un poids moléculaire réel de 54,3 kDa. Un plasmide similaire pourrait être créé à partir d'un ADNc de *mnd* correspondant au transcrit *mnd-RE*. La réalisation d'un Western Blot à partir de cellules transfectées avec ce plasmide permettrait de savoir si l'une des bandes obtenues avec l'anticorps anti-Mnd 61A1 correspond à l'isoforme de *mnd* possédant 11 domaines transmembranaires et un poids moléculaire réel de 46,4 kDa. Ces expériences pourraient également permettre de valider ou non l'existence de cette seconde isoforme. Si ces deux isoformes existent, il serait alors intéressant d'étudier les différences de fonction ou de répartition de ces deux isoformes chez la drosophile.

*CD98hc* semble être le meilleur candidat de chaîne lourde pour Mnd pouvant être identifié par bioinformatique. Les Western Blot réalisées à partir de cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* et *CD98hc*-HA semblent indiquer que Mnd peut s'associer avec *CD98hc* de façon covalente (Figure 87). Les expériences par co-immunoprécipitation permettront de

confirmer ce résultat et d'identifier d'autres partenaires potentiels de Mnd. L'utilisation d'anticorps très spécifiques est nécessaire pour la réalisation d'expériences par co-immunoprécipitation. La spécificité des anticorps anti-FLAG et anti-HA ayant été vérifiée (Figure 86 et Figure 87), ces expériences seront réalisées sur des cellules S2 sur-exprimant FLAG-*mnd* ou CD98hc-HA. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines immunoprécipitées avec FLAG-Mnd permettra d'obtenir une liste de protéines s'associant potentiellement avec Mnd. Cette liste pourra alors être comparée aux différentes chaînes lourdes putatives identifiées par bioinformatique. Cette analyse pourra être complétée par la réalisation de co-immunoprécipitations croisées entre FLAG-Mnd et CD98hc-HA à partir de lysats de cellules sur-exprimant ces deux protéines taguées.

Toutefois, la sur-expression de protéines dans des cellules peut entraîner l'association *in vitro* de chaînes légères et de chaînes lourdes qui ne s'associent pas en conditions physiologiques. Ainsi, Rossier et collaborateurs ont pu observer l'interaction entre la chaîne légère LAT2 et la chaîne lourde rBAT qui ne s'associent pas ensemble *in vivo*, en réalisant des co-immunoprécipitations à partir de lysats d'ovocytes de xénopes sur-exprimant ces deux protéines (Rossier *et al.*, 1999).

Une solution possible pour résoudre les problèmes liés à la sur-expression de FLAG-Mnd serait d'introduire la séquence codant pour le tag FLAG en amont du gène *mnd* directement dans le génome afin d'avoir une lignée de cellules S2 stable produisant Mnd à un niveau basal, directement tagué en N-ter. Le système CRISPR/*cas9* pourrait alors être utilisé pour mettre en place ce type de modification génétique (Bassett *et al.*, 2014; Böttcher *et al.*, 2014). Ce système pourrait également permettre de créer une lignée cellulaire stable délétée pour *mnd*, ce qui permettrait d'avoir un réel contrôle négatif pour les expériences de co-immunoprécipitation. Une telle lignée serait également très utile pour les expériences de transport d'acides aminés radiomarqués visant à identifier les substrats transportés par Mnd.

#### Partie 4 : Spécificité de transport de Minidiscs

L'étude de la spécificité de transport de Mnd est importante pour la compréhension des mécanismes cellulaires dans lesquels Mnd est impliqué. En effet, certains des acides aminés transportés par Mnd pourraient être à l'origine de son rôle dans le fonctionnement cérébral, en intervenant dans la neurotransmission par exemple. L'identification des différents types d'acides aminés ou dérivés d'acides aminés transportés par Mnd apportera

des renseignements importants pour comprendre à quel niveau Mnd peut intervenir dans l'activité nerveuse.

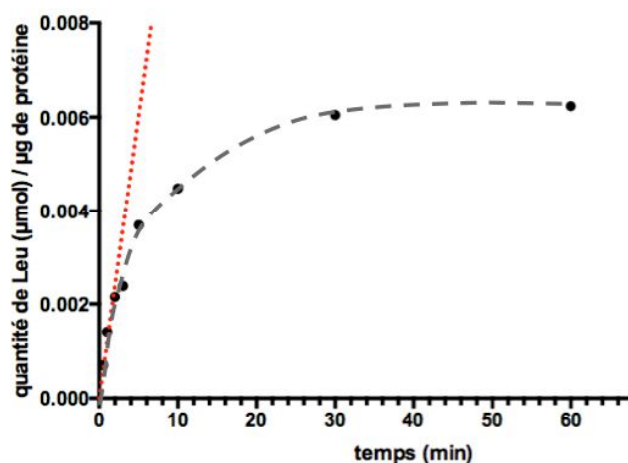
La leucine est le seul acide aminé connu actuellement pour être transporté par Mnd (Reynolds *et al.*, 2009). Lors de l'étude menée par Reynolds et collaborateurs, des cellules S2 ont été placées en présence de leucine dont une partie est marquée radioactivement au tritium. La quantité de leucine transportée à l'intérieur des cellules a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations. Ces expériences ont ensuite été réalisées sur des cellules S2 traitées avec des dsRNA-*mnd* pour réduire le nombre de transporteurs membranaires Mnd de ces cellules. Reynolds et collaborateurs ont alors pu observer une diminution d'environ 30 % de la quantité de leucine transportée à l'intérieur des cellules traitées et en déduire que Mnd transporte la leucine. Ces expériences ont aussi été réalisées avec des dsRNA-*Jhl-21* et ont permis de conclure que Jhl-21 transporte également la leucine (diminution d'environ 20% de l'import de leucine pour les cellules traitées) (Reynolds *et al.*, 2009).

Ces résultats ont servi de point de départ pour nos expériences de transport. Des dsRNA ciblant notamment *mnd* ont été synthétisés *in vitro* et transfectés dans des cellules S2 de drosophile en culture (*cf.* Partie 2-b du matériel et méthodes). Des expériences de transport de leucine radiomarquée ont été réalisées sur ces cellules (*cf.* Partie 5 du matériel et méthodes).

Afin de mettre au point ces expériences, nous avons d'abord étudié les paramètres cinétiques du transport de leucine dans les cellules S2 qui n'étaient pas décrits dans la publication de Reynolds et collaborateurs (Reynolds *et al.*, 2009). L'ensemble des résultats présentés dans cette partie a été obtenu par un travail en binôme avec Flore Geillon.

#### a) Propriétés du transport de leucine dans les cellules S2

La quantité de leucine importée dans les cellules S2 a été suivie au cours du temps (Figure 88). Ces expériences montrent que la quantité de leucine importée dans les cellules S2 varie en fonction du temps. Cette variation est linéaire pendant les 2 premières minutes de transport dans le cas d'une concentration extracellulaire de leucine de 50  $\mu\text{M}$  (concentration utilisée par Reynolds *et al.*, 2009). La vitesse d'import des transporteurs de leucine est donc maximale au début de l'incubation (vitesse initiale) et commence à diminuer à partir de 2 minutes. Au delà de 30 minutes, la quantité de leucine importée dans les cellules n'augmente plus, ce qui indique que la concentration de leucine s'est équilibrée entre le milieu intra et extracellulaire. La vitesse de transport de la leucine devient donc nulle à partir de 30 minutes d'incubation (dans le cas d'une concentration extracellulaire de leucine de 50  $\mu\text{M}$ ).



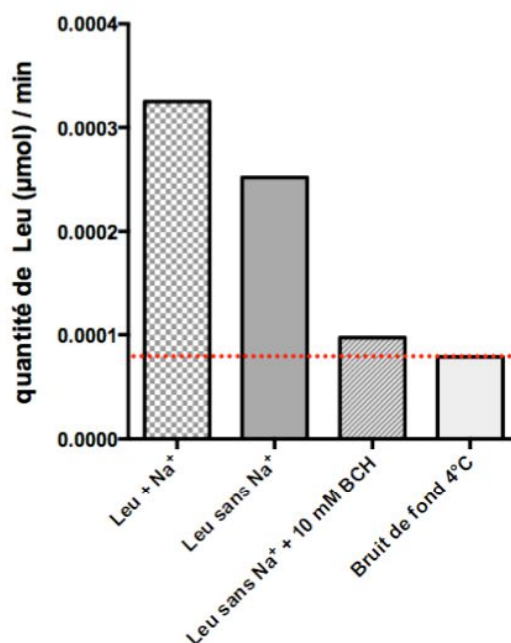
### Figure 88 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 au cours du temps

Les cellules S2 sont incubées dans une solution d'import sans sodium contenant 50  $\mu\text{M}$  de leucine dont 0,05  $\mu\text{M}$  de leucine tritiée pendant 30 secondes, 1 minute, 2 minutes, 3 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 30 minutes et 60 minutes.

Afin de travailler sur des transporteurs fonctionnant à leur vitesse de transport maximale (vitesse initiale), le temps d'incubation des cellules avec la leucine doit être inférieur à 2 minutes. L'ensemble des expériences suivantes a donc été réalisé pour 1 minute d'incubation.

Le transport de leucine par les transporteurs du système L chez les mammifères est sodium-indépendant et est inhibé par le BCH, un analogue synthétique d'acide aminé non métabolisable (Verrey *et al.*, 2004). Comme Mnd appartiendrait aux transporteurs du système L (Reynolds *et al.*, 2009), nous avons voulu déterminer la part de leucine transportée par des transporteurs du système L dans les cellules S2 (Figure 89). Pour déterminer la quantité de leucine radioactive fixée non spécifiquement sur les cellules (bruit de fond), des expériences ont été réalisées à 4°C, cette température permettant d'inhiber l'activité de tous les transporteurs (Yoon *et al.*, 2004). Après avoir enlevé le bruit de fond de nos résultats (trait rouge en pointillé ; Figure 89), ces expériences montrent que le BCH inhibe presque intégralement le transport de leucine dans les cellules S2, la quantité de leucine transportée à 25°C en présence de BCH étant proche de la quantité de leucine détectée à 4°C. Ces expériences indiquent également que la majorité de la leucine importée dans les cellules est transportée indépendamment de la présence de sodium, puisque l'absence de sodium ne réduit que d'environ 25% le transport de la leucine à 25°C. Ces deux résultats indiquent que la leucine est majoritairement importée dans les cellules S2 par des transporteurs du système L.

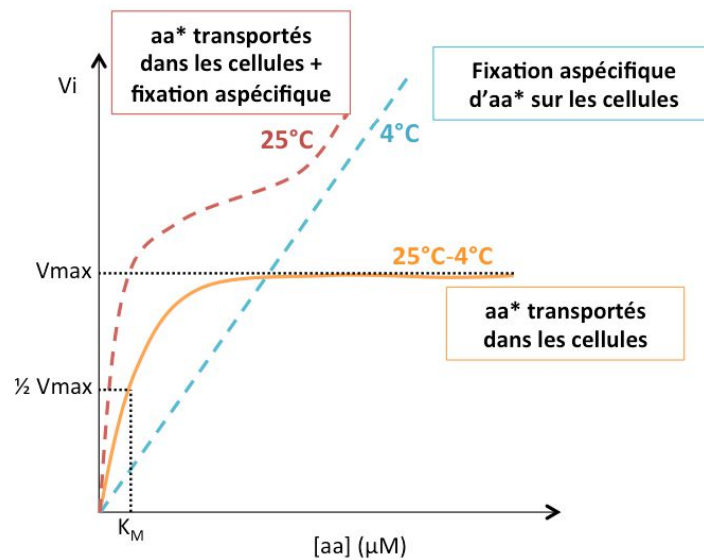




**Figure 89 : Effet du sodium, du BCH et de la température sur la quantité de leucine importée dans les cellules S2**

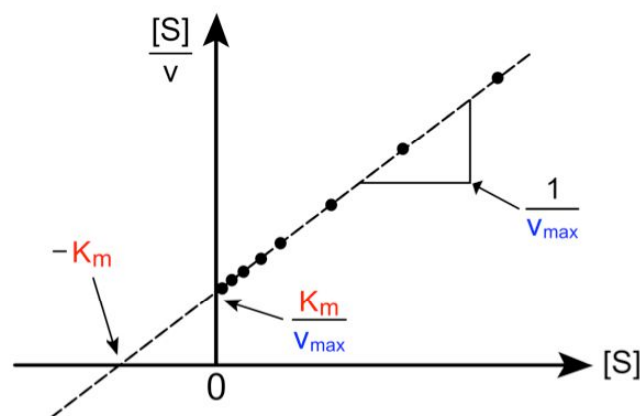
Les cellules S2 sont incubées à 25°C soit dans une solution d'import avec du sodium (les 125mM de choline-Cl sont remplacés par 125mM de NaCl), soit dans une solution d'import sans sodium, soit dans une solution d'import sans sodium avec 10 mM de BCH ou à 4°C dans une solution d'import sans sodium. Les expériences de transport sont réalisées en présence de 50 µM de leucine dont 0,05 µM de leucine tritiée avec un temps d'incubation de 1 minute.

Dans les cellules de mammifères, l'import de leucine est saturable et correspond à une cinétique de type michaelienne (Figure 90; Kim *et al.*, 2002; Mastroberardino *et al.*, 1998; Tomi *et al.*, 2005). Il est alors possible de tracer une courbe de Michaelis et Menten correspondant à l'import de leucine dans les cellules S2 en plaçant la vitesse initiale (soit la quantité de leucine transportée pendant 1 minute) en ordonnée et la concentration de leucine en abscisse. Cette courbe permet de déterminer un paramètre cinétique important qui est la constante de Michaelis ( $K_M$ ) du transporteur étudié et qui correspond à la concentration de leucine nécessaire pour être à la moitié de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ). Il est important de connaître cette constante lors de l'étude de la spécificité de substrat d'un transporteur afin de se placer en excès de substrat. Arbitrairement, une concentration de substrat équivalente à 10 fois le  $K_M$  est généralement utilisée pour être en excès de substrat. En effet, pour que la quantité de leucine transportée soit proportionnelle au nombre de transporteurs par cellule et non à leur vitesse de transport, la concentration de leucine utilisée doit permettre aux transporteurs d'être proches de leur vitesse maximale ( $V_{max}$ ).



**Figure 90 : Représentation Michaelienne du transport d'acides aminés (courbes théoriques)**  
 Représentation de la quantité d'acides aminés transportés par minute ( $V_i$ : vitesse initiale) en fonction de la concentration en acides aminés ( $[aa]$  en  $\mu M$ ). Le transport observé à  $25^\circ C$  est dû à l'import d'acides aminés radiomarqués ( $aa^*$ ) ainsi qu'au bruit de fond (fixation aspécifique). Les transporteurs ne fonctionnant pas à  $4^\circ C$ , seule la part de radioactivité due à la fixation aspécifique d' $aa^*$  est observée à cette température. Le bruit de fond augmente linéairement avec la concentration d' $aa^*$ . La courbe  $25^\circ C - 4^\circ C$  représente la quantité d' $aa$  réellement transportés dans les cellules.  $V_i$ : vitesse initiale ;  $V_{max}$ : vitesse maximale ;  $K_M$ : constante de Michaelis.

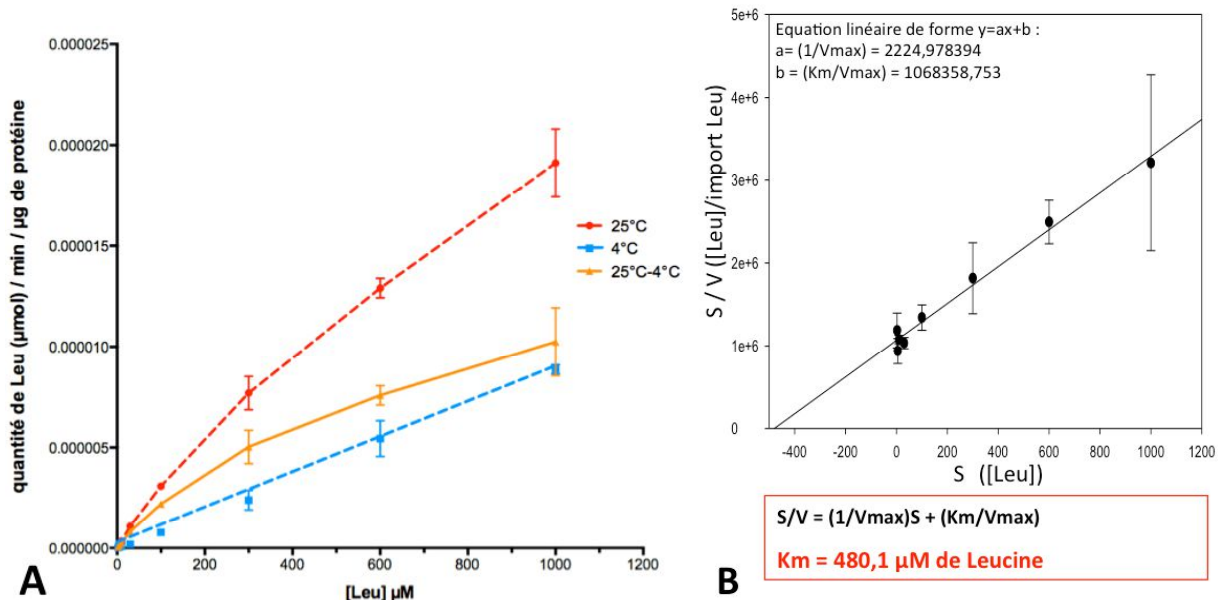
La représentation de Hanes-Woolf est l'une des transformations linéaires de la courbe de Michaelis et Menten permettant de déterminer rapidement et plus précisément la valeur de ces paramètres cinétiques (Figure 91 ; Ritchie et Prvan, 1996).



**Figure 91 : Représentation de Hanes-Woolf (droite théorique)**  
 Transformations linéaires de la courbe de Michaelis et Menten permettant une détermination précise des paramètres cinétiques d'une enzyme ou d'un transporteur.  $K_M$ : constante de Michaelis ;  $V$ : vitesse de transport ;  $V_{max}$ : vitesse maximale ;  $S$ : substrat.

Des mesures de transport de leucine ont donc été réalisées sur des cellules S2 à  $25^\circ C$  et à  $4^\circ C$  en absence de sodium pour différentes concentrations de leucine (Figure 92A). Comme chez le mammifère, l'import de leucine est saturable et correspond à une cinétique

Michaelienne avec un  $K_M$  de 480  $\mu\text{M}$  (Figure 92B). Il faudrait donc idéalement se placer à 4,8 mM de leucine (10 fois le  $K_M$ ) pour réaliser les expériences en excès de substrat. Pour cette concentration de leucine, les transporteurs de leucine fonctionneraient à 91% de la  $V_{\text{max}}$  (à titre indicatif, pour que les transporteurs fonctionnent à 100% de la  $V_{\text{max}}$ , il faudrait se placer à plus de 1000 fois le  $K_M$ ).



**Figure 92 : Représentation Michaelienne (A) et de Hanes-Woolf (B) de la quantité de leucine importée dans les cellules S2 en fonction de la concentration de leucine (valeurs expérimentales)**

(A) Représentation de Michaelis et Menten. Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant différentes concentrations de leucine (la part de leucine tritiée est donnée entre parenthèses) : 2,5  $\mu\text{M}$  ( $1,67 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 5  $\mu\text{M}$  ( $3,33 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 10  $\mu\text{M}$  ( $6,67 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 30  $\mu\text{M}$  ( $20 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 100  $\mu\text{M}$  ( $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 300  $\mu\text{M}$  ( $15 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 600  $\mu\text{M}$  ( $30 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) ; 1000  $\mu\text{M}$  ( $50 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ) (B) Représentation de Hanes-Woolf correspondante et détermination des paramètres cinétiques des transporteurs de leucine exprimés dans les cellules S2 ;  $K_M$  : constante de Michaelis ;  $V$  : vitesse de transport ;  $V_{\text{max}}$  : vitesse maximale ;  $S$  : substrat.

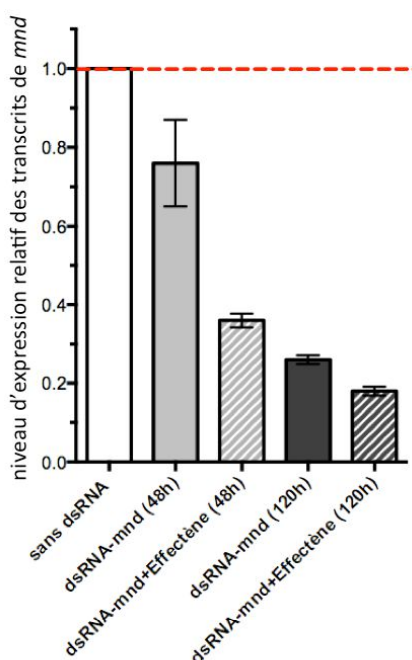
Cependant la quantité de leucine tritiée nécessaire pour se placer à 4,8 mM de leucine totale est trop importante. En effet, si la part de leucine tritiée est trop faible pour la concentration totale de leucine utilisée, alors le signal radioactif (DPM) à 25°C ne se détache pas du bruit de fond à 4°C. Après différents ajustements, une concentration de leucine de 2,5 mM a été choisie comme compromis (plus de 5 fois le  $K_M$ ) pour réaliser les expériences en « excès » de substrat. Pour cette concentration de leucine, les transporteurs de leucine fonctionnent à 84% de la  $V_{\text{max}}$ .

### b) Effet de la sous-expression de *minidiscs* sur le transport de leucine

Afin de reproduire la diminution du transport de leucine observée par Reynolds et collaborateurs, les cellules ont été traitées avec des dsRNA-*mnd*. Ces dsRNA ont été

internalisés dans les cellules S2, soit spontanément par endocytose, soit avec un agent de transfection (Effectène) (*cf.* Partie 2-b.2 du matériel et méthodes).

L'effet de l'incubation des cellules S2 en culture avec des dsRNA dirigés contre *mnd* sur la quantité de transcrits de *mnd* a été évalué par qPCR (*cf.* Partie 3-e du matériel et méthodes). Les résultats de qPCR obtenus pour les cellules S2 après traitement avec les dsRNA indiquent une importante diminution de la quantité de transcrits de *mnd* après 5 jours d'incubation par rapport aux cellules non traitées. En effet, alors qu'après 2 jours de traitement, cette diminution est d'environ 25% sans agent de transfection et d'environ 60% avec un agent de transfection (Effectène), la diminution de la quantité de transcrits de *mnd* est de 70% sans Effectène et de 80% avec Effectène après 5 jours d'incubation (Figure 93). Ces résultats indiquent que les dsRNA sont bien internalisés par les cellules et qu'ils induisent une diminution significative de la quantité de transcrits de *mnd*.

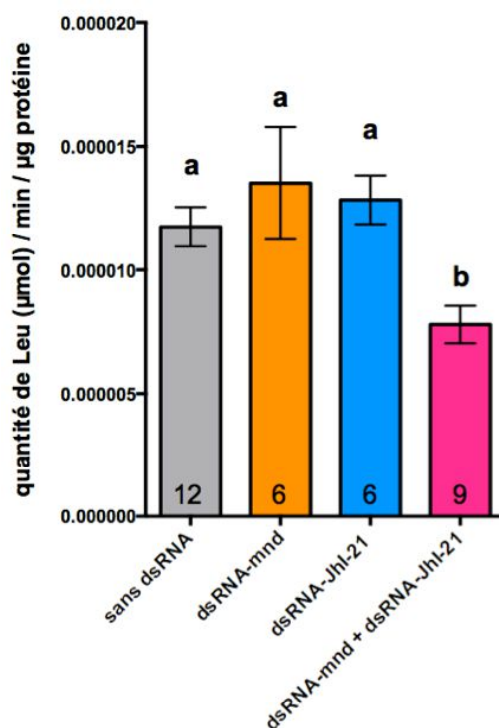


**Figure 93 : Niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* dans des cellules S2 en culture après 48 heures ou 120 heures d'incubation avec des dsRNA dirigés contre *mnd* (avec ou sans Effectène)**

Le gène de référence utilisé pour évaluer le niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) est la *tubuline*. Les cellules utilisées pour la condition de référence sont des cellules n'ayant pas subi de traitements aux dsRNA.

Des expériences de transport de leucine radiomarquée ont d'abord été réalisées sur des cellules témoins (sans dsRNA) et sur des cellules traitées avec des dsRNA dirigés contre *mnd* (Figure 94). Ces expériences n'ont permis d'observer aucune différence significative de transport de leucine entre les cellules sous-exprimant *mnd* et les cellules témoins. Ce résultat pourrait s'expliquer par une forte stabilité de la protéine Mnd. Dans ce cas, un traitement avec des dsRNA sur un total de 6 jours pourrait ne pas affecter le transport de

leucine car des protéines Mnd synthétisées en amont de ce traitement continueraient d'assurer ce transport. Ce résultat pourrait également être dû à la compensation du transport de leucine par un autre transporteur de leucine exprimé dans les cellules S2. D'après les travaux de Reynolds et collaborateurs, Jhl-21 transporte également la leucine dans les cellules S2 (Reynolds *et al.*, 2009).



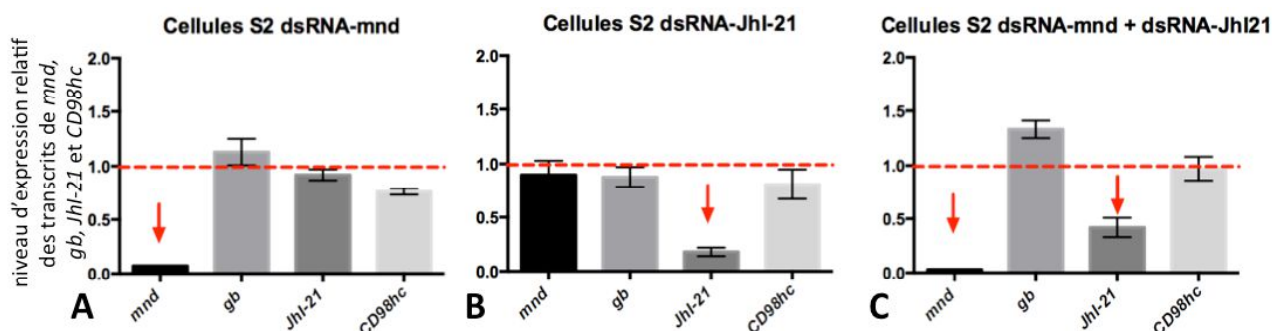
**Figure 94 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 non traitées ou traitées avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et/ou *Jhl-21***

Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant 2,5 mM de leucine dont 0,04 µM de leucine tritiée. Les cellules ont été traitées avec ou sans dsRNA en absence d'Effectène. Le nombre de réplicats pour chaque condition est indiqué dans la barre d'histogramme correspondante (tests statistiques : Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn).

Des expériences de transport de leucine radiomarquée ont donc été réalisées sur des cellules traitées avec des dsRNA dirigés contre *Jhl-21* (Figure 94). Ces expériences n'ont pas non plus permis d'observer de différence significative de transport de leucine entre les cellules témoins et les cellules traitées avec des dsRNA dirigés contre *Jhl-21*. Par contre, une diminution significative du transport de leucine est obtenue pour les cellules traitées à la fois avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et contre *Jhl-21* par rapport aux trois autres conditions (Figure 94). Ces résultats semblent indiquer qu'une compensation du transport de leucine a lieu entre Mnd et Jhl-21.

Cette compensation pourrait s'expliquer par une sur-expression de *Jhl-21* en réponse à la diminution de la quantité de transcrits de *mnd* après traitement avec des dsRNA-*mnd* et

inversement. Des expériences ont donc été réalisées pour savoir si les traitements utilisés (dsRNA-*mnd* ; dsRNA-*Jhl-21* ou dsRNA-*mnd* + dsRNA-*Jhl-21*) affectent spécifiquement le niveau d'expression des transcrits ciblés ou si ces traitements ont une répercussion sur le niveau d'expression des autres transcrits codant pour des protéines HAT. L'effet de ces différents traitements sur la quantité relative des transcrits de *CD98hc* (seule chaîne lourde identifiée à ce jour chez la drosophile), *Jhl-21*, *gb* et *mnd* a été évalué par qPCR (*CG1607* et *CG9413* ne sont pas exprimés dans les cellules S2 ; flybase.org) (Figure 95).



**Figure 95 : Niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd*, *gb*, *Jhl-21* et *CD98hc* dans des cellules S2 en culture traitées avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et/ou *Jhl-21***

Le gène de référence utilisé pour évaluer le niveau d'expression relatif des transcrits de *mnd*, *gb*, *Jhl-21* et *CD98hc* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) est la *tubuline*. Les cellules utilisées pour la condition de référence sont des cellules n'ayant pas subi de traitements aux dsRNA. Les cellules ont été traitées avec ou sans dsRNA en absence d'Effectène.

Ces résultats indiquent que le traitement avec les dsRNA dirigés contre *mnd* permet de diminuer drastiquement et spécifiquement la quantité de transcrits de *mnd*, sans affecter de façon notable le niveau d'expression de *gb*, *Jhl-21* et *CD98hc* (Figure 95A). De la même manière, le traitement avec les dsRNA dirigés contre *Jhl-21* permet de diminuer spécifiquement la quantité de transcrits de *Jhl-21*, sans affecter le niveau d'expression de *mnd*, *gb* et *CD98hc* (Figure 95B). Ces résultats indiquent que la compensation qui semble se mettre en place entre Mnd et Jhl-21 pour le transport de leucine n'est pas liée à une compensation au niveau transcriptionnel.

Le traitement réalisé à la fois avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et contre *Jhl-21* engendre une diminution drastique de la quantité de transcrits de *mnd* et une diminution de plus de 50% de la quantité de transcrits de *Jhl-21* (Figure 95C). Le niveau d'expression de *CD98hc* ne semble pas être affecté par ce double traitement. Par contre, le niveau d'expression de *gb* semblerait être légèrement augmenté, ce qui pourrait traduire un mécanisme de compensation transcriptionnel mis en place par la cellule. Cependant, cette expérience n'a été réalisée qu'en triplicat et des expériences complémentaires devront être effectuées pour confirmer ce résultat.

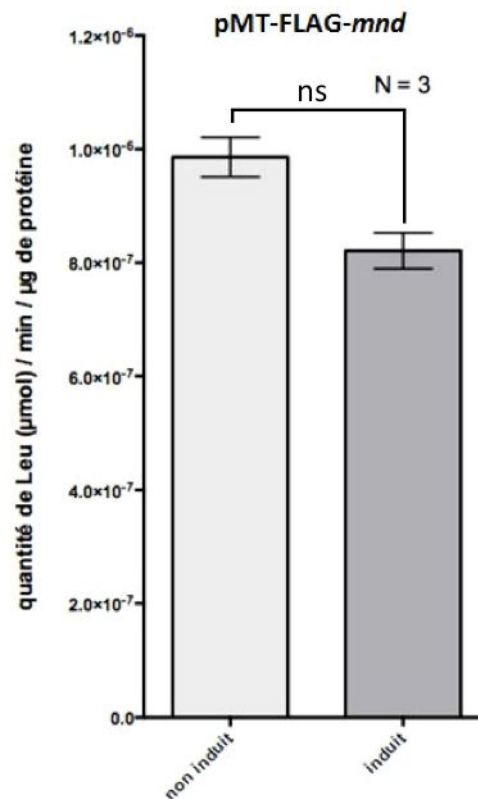
Les expériences menées sur des cellules présentant une réduction du niveau d'expression de *mnd* et *JhI-21* permettent donc d'observer une diminution du transport de leucine. Cependant, le but de ces expériences est d'étudier la spécificité de transport de Mnd uniquement, et non pas du couple Mnd/JhI-21. Pour obtenir des conditions expérimentales permettant d'observer une variation du transport de leucine qui ne soit imputable qu'à Mnd, de nouvelles mesures de l'import de leucine ont été réalisées sur des cellules transfectées sur-exprimant *mnd*.

### c) Effet de la sur-expression de *minidiscs* sur le transport de leucine

Lors des expériences de transport, si le nombre de cellules par puits varie (à cause des inévitables imprécisions de comptages et d'ensemencement des cellules par exemple), alors le nombre de transporteurs par puits varie également même si chaque cellule comporte le même nombre de transporteurs. Pour que la quantité d'acides aminés importés par cellule soit proportionnelle au nombre de transporteurs par cellule, tous les transporteurs doivent fonctionner à la même vitesse d'un puits à l'autre. Cette condition est obtenue en se plaçant en excès de substrat afin que tous les transporteurs soient à leur  $V_{max}$ . Dans ce cas, la quantité d'acides aminés importés par minute peut être normalisée par la quantité de protéine par puits (qui reflète le nombre de cellules par puits) afin de s'affranchir des variations liées à l'ensemencement des cellules.

Pour les expériences de transport réalisées sur cellules transfectées avec un vecteur d'expression inducible (tel que pMT-FLAG-*mnd*), une même suspension de cellules transfectées est séparée en deux. La moitié de cette suspension est induite tandis que l'autre moitié sert de témoin (non induite). Le nombre de cellules par puits est donc comparable. La quantité d'acides aminés importés par cellule est alors proportionnelle au nombre de transporteurs par cellule. Ces expériences peuvent donc être réalisées sans être en excès de substrat, à condition de ne comparer que les résultats obtenus à partir de la même suspension cellulaire. Les expériences de transport de leucine radiomarquée à partir de cellules transfectées ont donc été réalisées avec une concentration de leucine de 50  $\mu\text{M}$ .

Dans un premier temps, des expériences de transport de leucine radiomarquée ont été réalisées sur des cellules transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* induites ou non avec du sulfate de cuivre (Figure 96). D'après les résultats de cytométrie en flux, 40% des cellules devraient avoir intégré le plasmide après transfection avec pMT-FLAG-*mnd* (Figure 85A). Ces expériences n'ont pas permis d'observer de différence significative de transport de leucine entre les cellules induites et non induites (Figure 96).



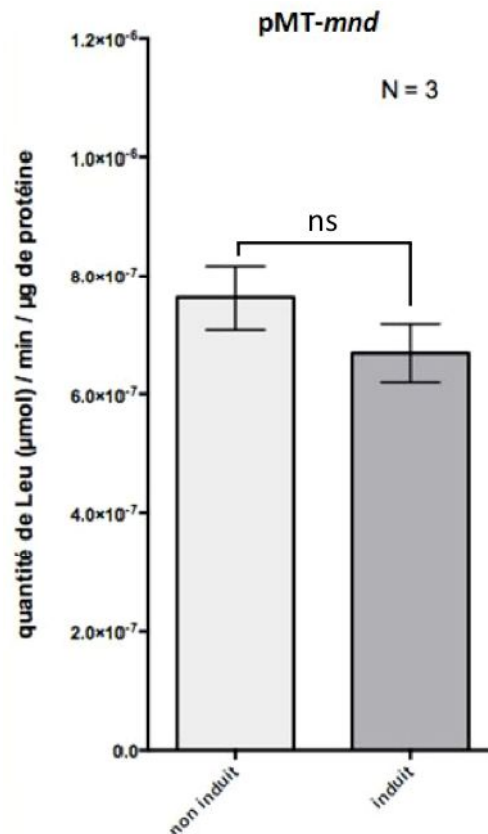
**Figure 96 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-FLAG-*mnd* induites ou non avec du sulfate de cuivre**

Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant 50 µM de leucine dont 0,025 µM de leucine tritiée ; N = nombre de réplicats ; ns = non significatif (tests statistiques : Mann-Whitney).

Les marquages réalisés sur des cellules transfectées avec pMT-FLAG-*mnd* ont montré que, comme chez les mammifères, le FLAG ne gêne pas la localisation du transporteur à la membrane (Figure 80). Même si ce tag ne modifie pas la fonctionnalité de ce transporteur dans les cellules de mammifères, celui-ci pourrait toutefois empêcher le transport de leucine dans les cellules S2 de drosophiles.

Afin de tester cette hypothèse, de nouvelles expériences de transport de leucine radiomarquée ont donc été réalisées sur des cellules transfectées avec le plasmide pMT-*mnd* induites ou non avec du sulfate de cuivre (Figure 97). Ces expériences n'ont pas non plus permis d'observer de différence significative de transport de leucine entre les cellules induites et non induites. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que seule la chaîne légère Mnd est sur-exprimée dans ces cellules et non la chaîne lourde qui lui est associée. La sur-expression de Mnd seul ne permettrait donc pas d'avoir un transporteur fonctionnel.



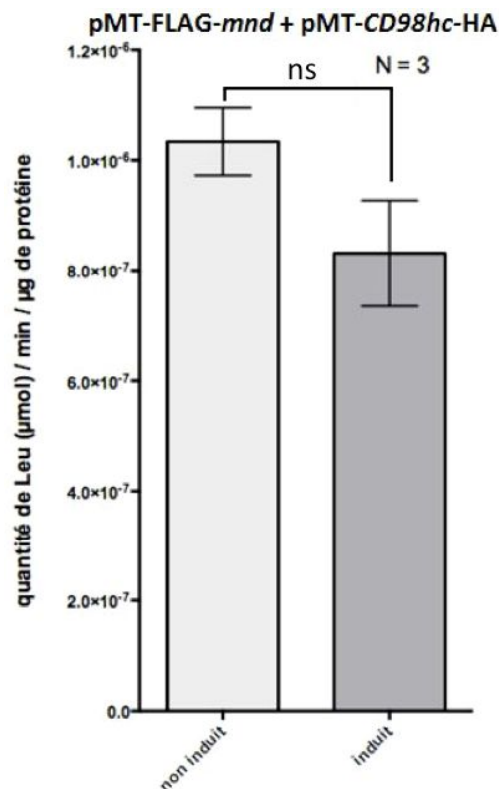


**Figure 97 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec le plasmide pMT-*mnd* induites ou non avec du sulfate de cuivre**

Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant 50 µM de leucine dont 0,025 µM de leucine tritiée ; N = nombre de répliquats ; ns = non significatif (tests statistiques : Mann-Whitney).

Afin de tester cette seconde hypothèse, de nouvelles expériences de transport de leucine radiomarquée ont donc été réalisées sur des cellules co-transfectées avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA induites ou non avec du sulfate de cuivre (Figure 98). La chaîne lourde CD98hc a été utilisée pour tester cette hypothèse car c'est la seule chaîne lourde identifiée à ce jour chez la drosophile. Toutefois, l'interaction de Mnd et de CD98hc n'a pas encore pu être prouvée et il est possible que CD98hc ne soit pas la chaîne lourde partenaire de Mnd.

D'après les résultats de cytométrie en flux, 31% des cellules devraient avoir intégré les deux plasmides après co-transfection avec pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA (Figure 85B). Ces expériences n'ont là encore pas permis d'observer de différence significative de transport de leucine entre les cellules induites et non induites (Figure 98).



**Figure 98 : Quantité de leucine importée dans les cellules S2 transfectées avec les plasmides pMT-FLAG-*mnd* et pMT-CD98hc-HA induites ou non avec du sulfate de cuivre**

Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant 50 µM de leucine dont 0,025 µM de leucine tritiée ; N = nombre de réplicats ; ns = non significatif (tests statistiques : Mann-Whitney).

À l'heure actuelle, le traitement des cellules avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et *Jhl-21* reste donc le seul moyen de modifier le niveau de transport d'un des substrats de Mnd dans les cellules S2.

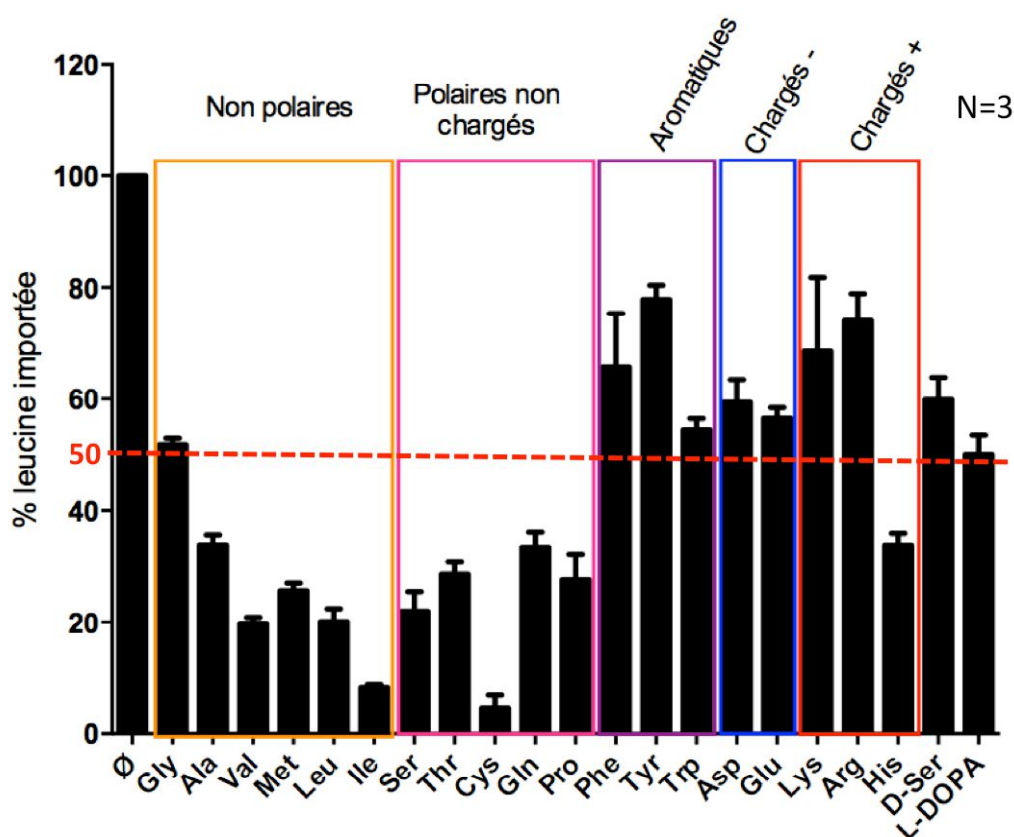
#### d) Inhibition du transport de leucine en présence d'acides aminés

Une méthode ayant été mise en place pour modifier le niveau de transport des acides aminés transportés par Mnd dans les cellules S2, des expériences de transport similaires à celles réalisées avec de la leucine radiomarquée devront être réalisées avec d'autres acides aminés radiomarqués.

Comme il serait coûteux de commander un grand nombre de substrats radiomarqués, notre but est de déduire quels sont les autres substrats potentiels de Mnd (et des transporteurs de leucine en général) par compétition de transport avec la leucine. Si d'autres acides aminés sont transportés par les transporteurs de leucine (incluant Mnd), alors ces acides aminés devraient diminuer l'import de leucine par compétition s'ils sont introduits en large excès par rapport à la leucine. Les transporteurs du système L (auxquels appartiendrait Mnd) sont des échangeurs d'acides aminés. Le sens du transport des acides

aminés échangés dépend de leur gradient de concentration, bien que certains substrats (tels que la leucine, l'isoleucine et la méthionine) soient préférentiellement exportés (Fotiadis *et al.*, 2013). Pour les acides aminés échangés avec la leucine, le fait de les placer en large excès par rapport à la leucine dans le milieu extracellulaire entraînera leur import dans les cellules et l'export de la leucine. Dans les deux cas, que les acides aminés introduits en excès dans le milieu extracellulaire entrent en compétition avec l'import de leucine ou entraînent son export, la quantité de leucine dans les cellules devrait diminuer.

Des expériences de transport de leucine radiomarquée en présence d'un excès de différents acides aminés non marqués ont donc été mises en place sur des cellules S2 non traitées (Figure 99).



**Figure 99 : Inhibition du transport de leucine dans les cellules S2 par différents acides aminés et dérivés**

Quantité relative de leucine importée en présence de 2 mM de différents acides aminés et dérivés non radiomarqués. Les cellules S2 sont incubées pendant 1 minute dans une solution d'import sans sodium contenant 20  $\mu$ M de leucine dont 0,013  $\mu$ M de leucine tritiée ; N = nombre de réplicats.

Les résultats de ces expériences semblent indiquer que tous les acides aminés ont une incidence plus ou moins prononcée sur le transport de leucine. En effet, selon les acides aminés, la diminution de transport de leucine par compétition peut aller de 20 à 95%. Les acides aminés modifiant drastiquement le transport de leucine (plus de 60% de diminution) sont l'histidine, les acides aminés polaires non chargés (serine, thréonine,

glutamine, cystéine et proline) et les acides aminés non polaires (alanine, valine, méthionine, isoleucine). L'inhibition du transport par la glycine (environ 50% de diminution) est moins importante que pour les autres acides aminés de cette catégorie. La présence des acides aminés chargés ou aromatiques ainsi que la L-DOPA et la D-Sérine entraîne une diminution du transport de leucine plus faible (20 à 50% de diminution).

#### e) Discussion et perspectives

L'étude de la spécificité de substrat de Mnd est nécessaire pour savoir dans quels mécanismes cellulaires Mnd est impliqué. Mnd pourrait par exemple jouer un rôle dans le fonctionnement du système nerveux en transportant des acides aminés impliqués dans la neurotransmission.

Des expériences de transport de l'un des substrats de Mnd par compétition avec d'autres substrats potentiels permettent de faire un crible d'acides aminés pouvant être transportés par Mnd. Ce type d'expérience par compétition a été utilisé pour définir la spécificité de substrats des transporteurs du système L de mammifères (Kim *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2004). Seuls les travaux de Reynolds et collaborateurs abordent la spécificité de substrat de Mnd et identifient la leucine comme étant l'un de ses substrats (Reynolds *et al.*, 2009). Afin de reproduire et confirmer ce résultat, des expériences de transport de leucine ont donc été réalisées sur des cellules témoins et des cellules sous-exprimant *mnd*. Cependant, seule la sous-expression de *mnd* combinée à celle de *Jhl-21* nous a permis d'observer une diminution significative du transport de leucine (Figure 94). Ce résultat semble indiquer qu'un mécanisme de compensation se met en place entre les deux transporteurs. Lors de ces expériences, la concentration de leucine utilisée était de 2,5 mM afin d'être en excès de substrat. Les expériences effectuées avec 50  $\mu$ M (concentration utilisée par Reynolds et collaborateurs) ne permettaient pas d'obtenir de résultats reproductibles d'une suspension cellulaire à l'autre, même si les cellules sont cultivées et traitées dans les mêmes conditions (*cf.* Partie 4-a des résultats). Ce problème a donc été résolu en se plaçant à une concentration de leucine 50 fois plus importante. Cependant, cette différence de concentration pourrait expliquer les différences de résultats observées. Le mécanisme de compensation qui semble intervenir entre Mnd et *Jhl-21* pour le transport de leucine pourrait se mettre en place seulement au delà d'une certaine concentration de substrat qui n'est pas atteinte à 50  $\mu$ M. Toutefois, la sous-expression de *Jhl-21* seul ne permet pas non plus d'observer de diminution du transport de leucine. Ces résultats confirment donc malgré tout l'implication de Mnd dans le transport de la leucine.

Le criblage réalisé par compétition avec le transport de leucine en utilisant différents acides aminés donne des indications pour identifier les différents substrats des transporteurs de leucine. Plus les transporteurs de leucine auront d'affinité avec un autre acide aminé et plus le transport de leucine sera diminué par cet acide aminé. Inversement si les transporteurs de leucine ne transportent pas un acide aminé, celui-ci n'affectera pas le transport de la leucine. Une inhibition partielle du transport de leucine est plus difficilement interprétable, celle-ci pouvant refléter, soit une faible affinité des transporteurs de leucine pour cet acide aminé, soit un comportement hétérogène des différents transporteurs de leucine vis à vis de cet acide aminé. En effet, une diminution intermédiaire du transport de leucine peut indiquer qu'une partie des transporteurs de leucine présentent une forte affinité pour l'acide aminé compétiteur, alors que d'autres ne le transportent pas.

Les expériences de compétition menées sur cellules S2 semblent indiquer que tous les acides aminés ont un effet plus ou moins important sur le transport de leucine. Les acides aminés non polaires et polaires non chargés sont ceux qui diminuent le plus fortement le transport de leucine. Ces acides aminés seront donc à tester en priorité sur des cellules témoins et sur des cellules sous-exprimant *mnd* et/ou *Jhl-21*. Ces expériences de transport direct, similaires à celles réalisées avec la leucine, permettront de savoir quels sont les autres substrats de Mnd.

Le traitement des cellules avec des dsRNA dirigés contre *mnd* et *Jhl-21* est le seul moyen qui a pu être mis en place permettant d'observer une modification du niveau de transport d'un substrat de Mnd. Cependant, il est possible que la compensation s'opérant entre *Jhl-21* et Mnd pour le transport de leucine n'intervienne pas pour d'autres acides aminés. La sous-expression de *mnd* seul pourrait alors être suffisante pour observer une diminution du transport d'un autre substrat de Mnd.

Afin de mettre en place un autre système permettant d'étudier la spécificité de transport de Mnd, de nouvelles mesures de l'import de leucine ont été réalisées sur des cellules sur-exprimant FLAG-*mnd*. Cependant, ces expériences n'ont pas permis d'observer d'augmentation du transport de la leucine pour ces cellules par rapport aux cellules témoins (Figure 96). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que seule la chaîne légère Mnd est sur-exprimée dans ces cellules et non la chaîne lourde qui lui est associée. La sur-expression de Mnd avec son partenaire protéique pourrait permettre de résoudre ce problème.

Les expériences de co-immunoprécipitation devraient permettre d'identifier le ou les partenaires protéiques de Mnd (*cf.* Partie 3-c des résultats). Afin de confirmer que les protéines identifiées par co-immunoprécipitation sont bien des partenaires de Mnd permettant la formation de transporteurs fonctionnels, des expériences de transport de leucine pourraient être réalisées sur des cellules sur-exprimant Mnd et son/ses partenaire(s) protéique(s). Différents types cellulaires pourraient être utilisés pour ces expériences, tels que des cellules de drosophiles n'exprimant pas *mnd* (comme la lignée de cellules OSS ; <http://flybase.org/>) ou un système hétérologue (comme des ovocytes de xénopes). Des expériences similaires ont été réalisées par Reynolds et collaborateurs en sur-exprimant JhI-21 et CD98hc dans des ovocytes de xénopes (Reynolds *et al.*, 2009). Une augmentation du transport de leucine a pu être observée pour les ovocytes après injection d'ADNc de *JhI-21* et *CD98hc*, ce qui indique que JhI-21 et CD98hc forment un transporteur fonctionnel. De telles expériences ont également été réalisées pour des ovocytes de xénopes sur-exprimant Mnd et CD98hc mais n'ont pas permis d'observer d'augmentation du transport de leucine (Reynolds *et al.*, 2009). Ces résultats pourraient signifier que CD98hc n'est pas la chaîne lourde endogène de Mnd même si ces deux protéines semblent s'associer *in vitro* (Figure 87). Cependant, le complexe Mnd/CD98hc pourrait exister *in vivo* mais nécessiter la présence d'un autre partenaire pour être fonctionnel. Ce partenaire potentiel pourrait être présent dans une lignée cellulaire de drosophile telle que la lignée de cellules S2. Des expériences de transport de leucine ont été réalisées sur des cellules S2 sur-exprimant FLAG-*mnd* et *CD98hc*-HA afin de tester cette hypothèse. Les expériences de Campbell et Thompson menées sur des hépatocytes de souris sur-exprimant FLAG-*LAT1* et *CD98hc*-HA ont montré que ces tags ne perturbent pas la fonctionnalité de ces transporteurs (Campbell et Thompson, 2001). Les expériences d'immunocytologie effectuées sur des cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* et *CD98hc*-HA indiquent que Mnd et CD98hc tagués se répartissent bien à la membrane plasmique des cellules (Figure 81). Toutefois, la sur-expression de FLAG-*mnd* et *CD98hc*-HA n'a pas non plus permis d'observer d'augmentation du transport de leucine dans les cellules S2 co-transfectées. Si CD98hc n'est pas la chaîne lourde de Mnd, ce résultat peut s'expliquer par un nombre insuffisant de partenaires de Mnd dans les cellules S2 pour former suffisamment de complexes fonctionnels. Cependant, ces résultats peuvent également s'expliquer par le nombre insuffisant du second partenaire potentiel qui rendrait le complexe Mnd/CD98hc fonctionnel, cet autre partenaire n'étant pas exprimé au même niveau que Mnd et CD98hc. Ce résultat pourrait aussi être lié à une induction trop forte entraînant une surproduction

de protéines non compatible avec le fonctionnement physiologique des transporteurs. Des inductions avec des concentrations de sulfate de cuivre moins élevées pourraient donc être envisagées pour tester cette hypothèse.

Comme vu précédemment, la création d'une lignée cellulaire stable délétée pour *mnd* (en utilisant le système CRISPR/*cas9* par exemple) permettrait également de pouvoir étudier la spécificité de substrat de Mnd par un autre moyen que les traitements avec des dsRNA ou la sur-expression de *mnd*. Cette méthode permettrait de s'affranchir des problèmes liés à la sur-expression d'une protéine dans les cellules S2 ou liés à la potentielle stabilité des protéines après un traitement aux dsRNA.

# DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION





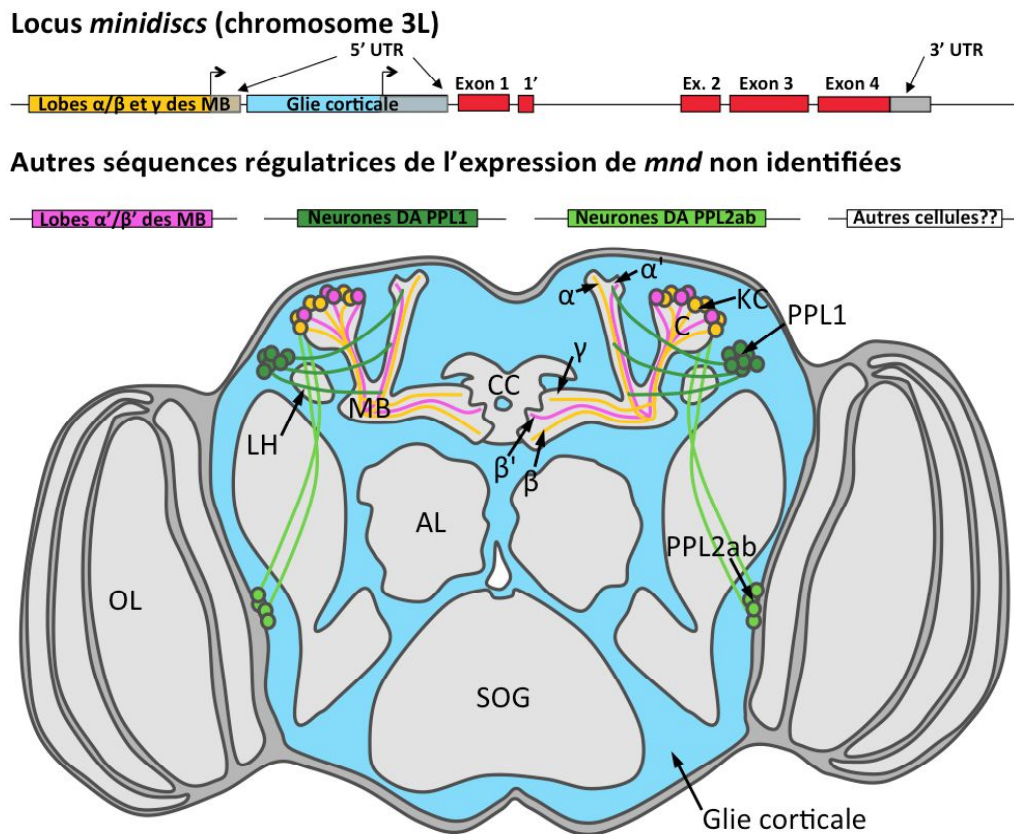
## DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Le principal objectif de mon projet de thèse était d'étudier le rôle de *Mnd* dans le système nerveux central de *Drosophila melanogaster*. *Mnd* semble être un transporteur d'acides aminés appartenant au groupe des chaînes légères HAT du système L (Reynolds *et al.*, 2009). *Mnd* serait donc un orthologue de la chaîne légère LAT1 ou LAT2 de mammifères (Tableau VI). Les transporteurs du système L de mammifères ont principalement été décrits pour leur rôle dans la prolifération cellulaire (Kanai et Endou, 2001; Kurayama *et al.*, 2011; Yanagida *et al.*, 2001). Bien que LAT1 et LAT2 soient exprimés dans le cerveau (Fotiadis *et al.*, 2013), le rôle des transporteurs du système L dans le fonctionnement du système nerveux n'a pas été décrit. Le cerveau des drosophiles, moins complexe que celui des mammifères (un million de fois moins de neurones que dans le cerveau humain; O'Kane, 2011), est un très bon modèle pour entreprendre l'étude du rôle d'un transporteur du système L dans le fonctionnement du système nerveux.

Ce travail de thèse a donc débuté par la caractérisation du profil d'expression de *mnd* dans le cerveau de drosophile adulte.

Après avoir vérifié que *mnd* est bien exprimé dans le système nerveux central (Figure 34), des marquages sur cerveaux de drosophiles adultes ont été réalisés et montrent que *Mnd* est présent à la fois dans certains neurones et dans certaines cellules gliales du cerveau (Figure 39). *Mnd* est notamment localisé au niveau du corps cellulaire des neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (Figure 56) et des neurones dopaminergiques PPL1 et PPL2ab (qui sont des neurones afférents aux corps pédonculés; Figure 58) ainsi que dans les cellules gliales du cortex (Figure 51 et Figure 100).

Deux séquences génomiques permettant l'expression de *mnd* respectivement dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (séquence 24-1) et dans la glie corticale (séquence 25-1) ont pu être identifiées (Figure 46 et Figure 100). Ces deux séquences se situent dans la région promotrice de *mnd* en amont du premier exon (la séquence 27-1 correspond à la combinaison des séquences 24-1 et 25-1). Une troisième séquence régulatrice (26-1) a également été identifiée dans le premier intron de *mnd* et semble être spécifique des cellules gliales du système visuel (Figure 47). Ces séquences régulatrices ne permettent pas de représenter de façon exhaustive le profil d'expression de *mnd*, ce qui suggère fortement que d'autres régions génomiques non identifiées sont impliquées dans la régulation de l'expression de ce gène (Figure 100).



**Figure 100 : Profil d'expression connu de *mnd* dans le cerveau de drosophile adulte**

Différentes régions génomiques sont impliquées dans la régulation de l'expression de *mnd* dans le cerveau de drosophile adulte. Deux séquences du locus *mnd* régulent l'expression de *mnd* respectivement dans les neurones des lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (Mnd est présent au niveau du corps cellulaire des cellules de Kenyon) et dans les cellules gliales du cortex. D'autres régions génomiques (dont la localisation n'a pas été identifiée) régulent l'expression de *mnd* dans les neurones des lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés et dans les groupes de neurones dopaminergiques PPL1 et PPL2ab. L'expression de *mnd* ne se limite probablement pas à ces types cellulaires, le profil d'expression de *mnd* n'ayant pas été décrit intégralement. MB: Corps Pédonculés; C: Calice;  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\gamma$ : Lobes des corps pédonculés; KC: Cellules de Kenyon; AL: Lobe Antennaire; SOG: Ganglion sous-œsophagien; CC: Complexe Central; LH: Corne Latérale; OL: Lobe Optique; DA: Dopaminergique; Ex.: Exon; UTR: Région non traduite.

Mnd étant présent dans le cerveau, ce transporteur d'acides aminés pourrait être impliqué dans le fonctionnement du système nerveux central. En effet, certains des acides aminés transportés par Mnd pourraient par exemple intervenir dans la neurotransmission. Si c'est le cas, la dérégulation de l'expression de *mnd* devrait perturber l'activité nerveuse. Différentes méthodes, telles que l'étude du comportement, peuvent permettre la mise en évidence d'une telle perturbation. L'effet de la dérégulation de l'expression de *mnd* a donc été observé sur différents comportements choisis en fonction des rôles connus des structures cérébrales dans lesquelles la présence de Mnd a pu être détectée.

La présence de Mnd dans les neurones des corps pédonculés, dans certains neurones dopaminergiques et dans les cellules gliales du cortex indique que ce transporteur pourrait avoir un rôle dans l'activité locomotrice (Pereanu *et al.*, 2007; Serway *et al.*, 2009),

l'olfaction (Grosjean *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003), l'apprentissage et la mémoire (Güven-Ozkan et Davis, 2014; Matsuno *et al.*, 2015) ou encore le réflexe de géotaxie négative (Barone et Bohmann, 2013; Riemensperger *et al.*, 2013).

Quatre paradigmes comportementaux ont donc été utilisés pour évaluer l'implication de Mnd dans ces comportements en dérégulant son expression dans différents types cellulaires. Les séquences régulatrices de *mnd* ont été utilisées dans un premier temps pour déréguler spécifiquement l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés (séquence 24-1) ou dans les cellules gliales du cortex (séquence 25-1) (Figure 46). Ces expériences n'ont pas permis d'impliquer clairement l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés ou dans la glie corticale dans l'un des comportements testés. Toutefois, les différences de comportement observées lors de la première série de tests de choix olfactif (Figure 63) suggèrent que l'expression de *mnd* dans ces deux types cellulaires pourrait être impliquée dans la motivation pour la recherche de nourriture. Ces différences ne pouvant pas s'expliquer par un défaut olfactif général (Figure 66) ou locomoteur (Figure 62), d'autres tests devront être mis en place pour déterminer l'origine de ce phénotype. Par ailleurs, la première série de tests de mémoire olfactive avait permis d'observer des différences significatives entre les drosophiles dont l'expression de *mnd* est dérégulée dans les neurones formant les lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et les drosophiles témoins (Figure 67). Cependant, ces tests n'ont pas pu être reproduits par la suite (Figure 68) et de nouveaux tests devront être mis en place pour affirmer ou infirmer le rôle de Mnd dans la mémoire olfactive à court et moyen terme. Par ailleurs, les tests de mémoire et d'apprentissage devront être poursuivis pour connaître l'implication potentielle de Mnd dans la mémoire à long terme.

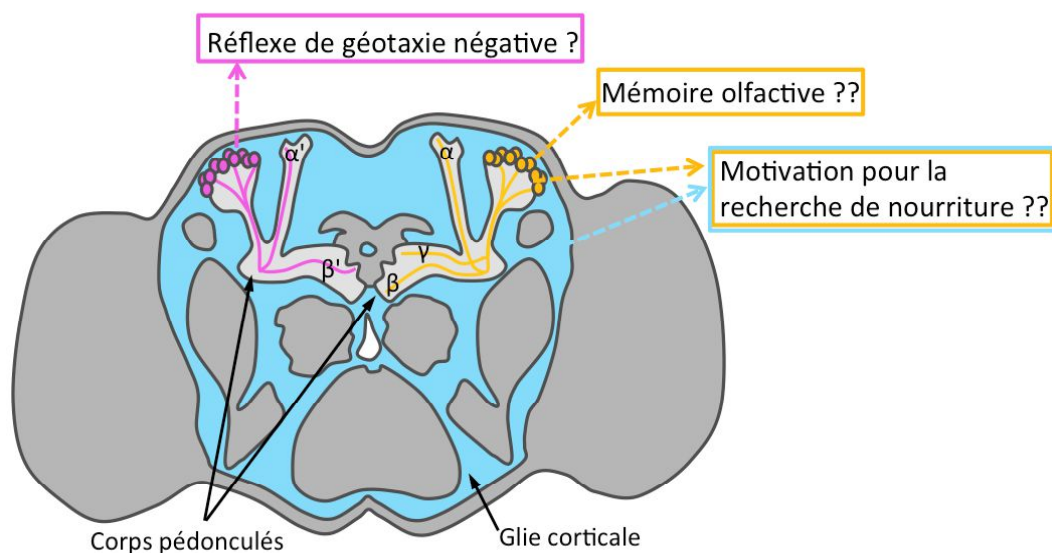
Les séquences régulatrices permettant l'expression de *mnd* dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés et dans les groupes de neurones dopaminergiques PPL1 et PPL2ab n'étant pas connues, d'autres lignées Gal4 permettant de cibler ces deux types de neurones ont été utilisées (c305a-Gal4 et TH-Gal4). Ces lignées ont été utilisées pour déréguler l'expression de *mnd* dans ces deux types cellulaires et étudier l'effet de cette dérégulation sur le réflexe de géotaxie négative des drosophiles. Ces tests semblent indiquer que la présence de Mnd dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés (ou potentiellement dans le complexe central ; Figure 73) serait impliquée dans ce réflexe de « climbing » (Figure 72). D'autres tests comportementaux pourront être réalisés par la suite avec ces deux lignées Gal4 pour déterminer si la présence de Mnd dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés et dans les groupes de neurones

dopaminergiques PPL1 et PPL2ab est impliquée dans d'autres comportements, tels que la mémoire olfactive.

Les corps pédonculés et les cellules gliales du cortex sont également connus pour leur rôle dans la parade ou dans le sommeil (Bushey et Cirelli, 2011; Zars, 2000; Zwarts *et al.*, 2014). L'implication putative de Mnd dans ces comportements pourra être étudiée par la suite.

Par ailleurs, la caractérisation du profil d'expression de *mnd* dans le cerveau pourra être poursuivie par la réalisation de nouveaux marquages. En fonction des structures nerveuses dans lesquels la présence de Mnd aura été détectée, de nouveaux tests comportementaux pourront être envisagés et les tests déjà mis en place pourront être poursuivis en diminuant l'expression de *mnd* dans ces différents types cellulaires.

Ces expériences de comportement suggèrent que Mnd pourrait intervenir dans le réflexe de géotaxie négative et potentiellement dans la mémoire olfactive et la motivation pour la recherche de nourriture (Figure 101). La présence de Mnd dans le cerveau semble donc avoir un rôle dans la régulation de l'activité neuronale. Toutefois, ce rôle semble être spécifique de quelques comportements puisque la diminution de l'expression de *mnd* dans une structure nerveuse ne perturbe pas de façon drastique tous les comportements dans lesquels cette structure est impliquée.



### Figure 101 : Rôle putatif de Minidiscs sur le comportement

Les tests comportementaux semblent indiquer que la présence de Mnd dans les neurones formant les lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés pourrait avoir un rôle sur le réflexe de géotaxie négative ; que la présence de Mnd dans les neurones des lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés pourrait potentiellement intervenir dans la mémoire olfactive ; et que la présence de Mnd dans les neurones des lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et dans la glie corticale serait éventuellement impliquée dans la motivation pour la recherche de nourriture.

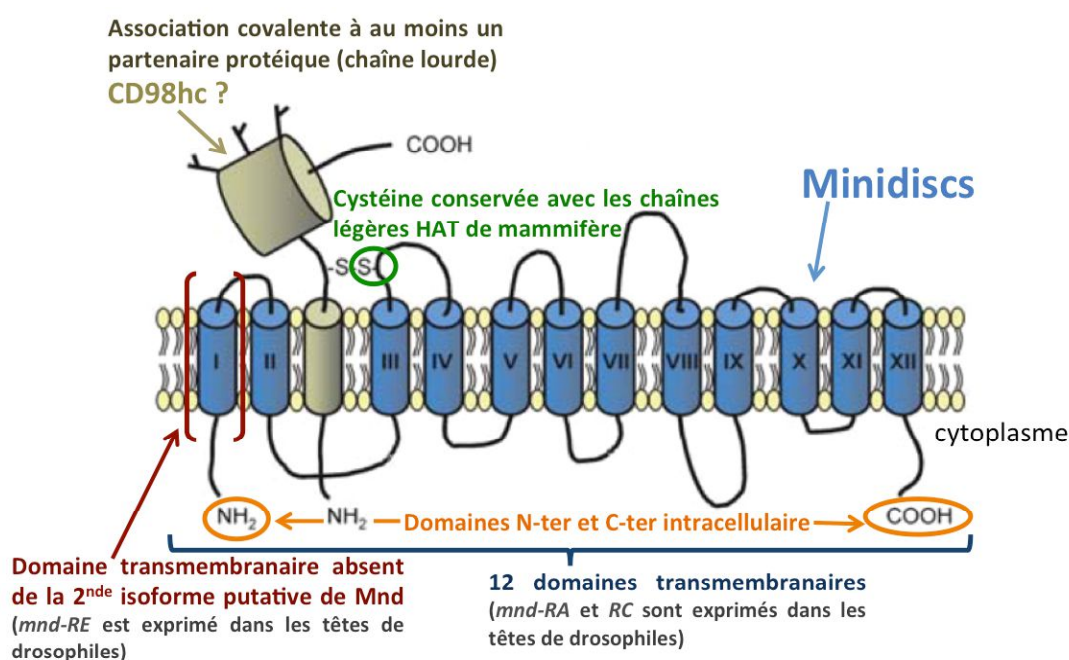
Pour comprendre comment Mnd pourrait intervenir dans le système nerveux, d'autres expériences ont été réalisées pour appréhender le fonctionnement de ce transporteur au niveau moléculaire.

Quatre transcrits de *mnd* (*mnd-RA*, *RC*, *RD* et *RE*) menant théoriquement à la synthèse de deux isoformes de Mnd ont été décrits (<http://flybase.org/>). À l'exception de *mnd-RD* dont l'existence n'a pas pu être prouvée, ces transcrits sont bien exprimés dans les têtes de drosophiles (Figure 37). L'isoforme correspondant aux transcrits *mnd-RD*, *RC* et *RA* possède 12 domaines transmembranaires, des extrémités N-ter et C-ter intracellulaires, une cystéine conservée au niveau de la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire et un poids moléculaire d'environ 50 kDa comme les chaînes légères HAT de mammifères (Figure 75A) (Verrey *et al.*, 2004). L'isoforme correspondant au transcrit *mnd-RE* posséderait quant à elle 11 domaines transmembranaires, une extrémité N-ter extracellulaire, une extrémité C-ter intracellulaire et une cystéine conservée au niveau de la 1<sup>ère</sup> boucle extracellulaire (Figure 75B). Bien que l'existence du transcrit *mnd-RE* ait été confirmée (Figure 37), l'existence de l'isoforme protéique lui correspondant n'a pas été démontrée.

Chez les mammifères, les chaînes légères HAT s'associent de façon covalente à une chaîne lourde pour former un transporteur fonctionnel (Palacín *et al.*, 2005). La réalisation de Western Blot sur des cellules S2 sur-exprimant FLAG-*mnd* dans des conditions permettant de préserver les ponts disulfures a permis de montrer que, comme chez le mammifère, Mnd s'associe bien de façon covalente à un partenaire protéique (Figure 86). CD98hc semble être le meilleur candidat de chaîne lourde HAT de drosophile qui puisse être identifié par bioinformatique. En effet, la conformation de CD98hc est semblable à celle des chaînes lourdes HAT de mammifères (extrémité N-ter intracellulaire, un seul domaine transmembranaire, domaine C-ter extracellulaire possédant une cystéine conservée à proximité du domaine transmembranaire) (Figure 76A) (Verrey *et al.*, 2004). De plus, CD98hc est bien exprimé dans les têtes de drosophiles (Figure 78). Les Western Blot réalisés à partir de cellules S2 sur-exprimant FLAG-*mnd* et CD98hc-HA semblent indiquer que Mnd s'associe avec CD98hc de façon covalente, ce qui devra être confirmé par co-immunoprécipitation (Figure 87). Toutefois, la sur-expression de protéines dans des cellules peut entraîner l'association entre des chaînes légères et des chaînes lourdes qui ne s'associent pas *in vivo* (Rossier *et al.*, 1999). Les expériences de transport d'acides aminés peuvent permettre de savoir si l'association entre une chaîne légère et une chaîne lourde mène à la formation d'un transporteur fonctionnel. Mnd étant connu pour être un transporteur de leucine (Reynolds *et al.*, 2009), des expériences de transport de leucine

radiomarquée ont donc été réalisées sur des cellules S2 sur-exprimant FLAG-*mnd* et CD98hc-HA. Cependant, ces expériences n'ont pas permis d'observer d'augmentation du transport de leucine dans ces cellules (Figure 98). De la même manière, Reynolds et collaborateurs n'avaient pas observé d'augmentation du transport de leucine pour des ovocytes de xénope co-exprimant *mnd* et CD98hc (Reynolds *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent soit que Mnd et CD98hc ne forment pas un complexe fonctionnel (même s'ils peuvent s'associer de façon covalente), soit que ce complexe nécessite la présence d'un autre partenaire pour être fonctionnel. La réalisation de co-immunoprécipitations croisées entre FLAG-Mnd et CD98hc-HA à partir de lysats de cellules sur-exprimant ces deux protéines taguées pourrait permettre l'identification d'un tel partenaire. Les expériences de co-immunoprécipitation à partir de lysat de cellules sur-exprimant FLAG-*mnd* pourraient par ailleurs permettre la mise en évidence d'autres candidats de chaîne lourde pour Mnd.

Comme chez le mammifère, Mnd s'associe donc bien de façon covalente avec au moins un partenaire protéique et la conformation de Mnd est semblable à celle des chaînes légères HAT de mammifères (Figure 102).



**Figure 102 : Description des caractéristiques moléculaires de Mnd**

Minidisks possède les mêmes caractéristiques que les chaînes légères HAT de mammifères (12 domaines transmembranaires, extrémités N-ter et C-ter intracellulaires, une cystéine conservée au niveau de la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire, association covalente avec au moins un partenaire protéique) (modifié d'après Verrey *et al.*, 2004).

Les caractéristiques moléculaires de Mnd ayant été décrites, des expériences de transport d'acides aminés permettant d'étudier la spécificité de substrat de Mnd ont été

mises en place afin de mieux comprendre le rôle de ce transporteur dans le fonctionnement du système nerveux. Mnd ayant été décrit comme étant un transporteur de leucine appartenant au système L (Reynolds *et al.*, 2009), la leucine a été choisie pour débiter les expériences de transport d'acides aminés sur des cellules S2 de drosophiles en culture. Le transport de leucine dans les cellules S2 est assuré à environ 75% par des transporteurs du système L (transport de leucine sodium-indépendant inhibé par le BCH ; Figure 89). Les transporteurs du système L appartiennent aux sous-familles SLC7 et SLC43 (Tableau VI et Tableau XVII). Les transporteurs SLC7 appartenant au système y<sup>+</sup>L (Tableau VII) ainsi que certains transporteurs de la sous-famille SLC38 sont quant à eux impliqués dans le transport sodium-dépendant de la leucine (Tableau XVI).

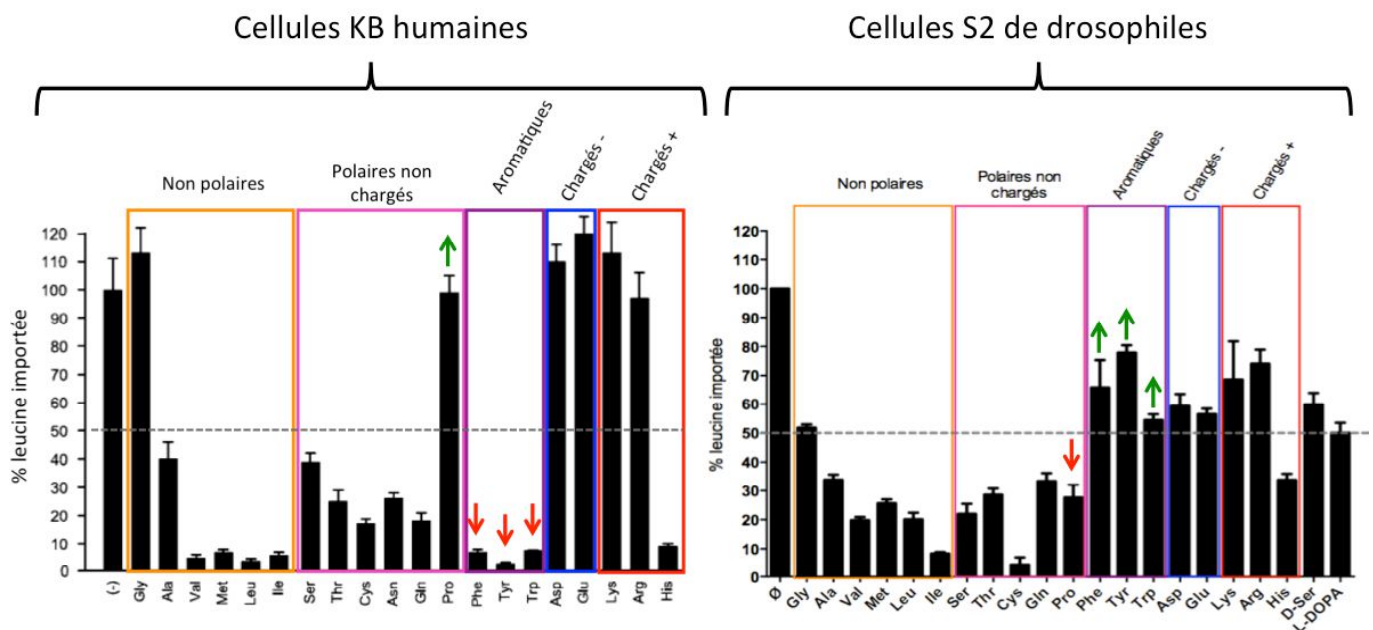
Lors des expériences de transport de leucine radioactive menées au laboratoire, seule la diminution simultanée de l'expression de *mnd* et de *Jhl-21* a permis d'observer une modification du transport de leucine dans les cellules S2 (Figure 94). La diminution de l'expression de *mnd* ou de *Jhl-21* seule n'a pas d'effet sur le transport de leucine. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme de compensation intervient entre Mnd et Jhl-21 pour assurer le transport de leucine, ce mécanisme n'étant pas d'ordre transcriptionnel (Figure 95). Pour savoir si cette compensation observée *in vitro* pourrait exister *in vivo*, il serait intéressant de comparer les profils d'expression de *mnd* et de *Jhl-21* afin de déterminer s'ils sont exprimés dans les mêmes cellules. Si c'est le cas, la localisation cellulaire de Mnd et Jhl-21 (membrane plasmique, mitochondrie, réticulum, golgi, corps cellulaire ou axones pour les neurones, ...) pourrait alors être comparée pour connaître la fonction spécifique de chacun de ces transporteurs au niveau cellulaire. La présence de Mnd et de Jhl-21 dans les mêmes cellules a pu être mise en évidence pour les cellules productrices d'insuline (Manière *et al.*, en préparation ; Ziegler *et al.*, en préparation) et pourrait concerner d'autres types cellulaires du cerveau.

Afin d'identifier les acides aminés potentiellement transportés par Mnd, des expériences par compétition de transport entre la leucine et différents acides aminés ont été réalisées sur des cellules S2 (Figure 99). Ce type d'expériences par compétition a permis d'identifier les acides aminés transportés par les transporteurs du système L chez le mammifère (Kim *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2004). Les résultats obtenus pour des cellules humaines (cellules KB de carcinome épidermoïde oral) et de drosophiles (cellules S2 embryonnaires) indiquent que la spécificité de substrat des transporteurs du système L de ces deux espèces est relativement similaire (Figure 103). Dans les deux cas, les acides aminés chargés positivement et négativement ont un effet limité sur le transport de leucine à l'exception de



l'histidine, ce qui indique que les transporteurs du système L ont une faible affinité pour les acides aminés chargés. À l'inverse, les acides aminés non chargés polaires et apolaires diminuent d'au moins 60% l'import de leucine dans les cellules à l'exception de la glycine. Par contre, les transporteurs du système L n'ont pas la même affinité entre mammifères et insectes vis à vis de la proline, celle-ci ne perturbant pas l'import de leucine pour les cellules humaines alors qu'elle diminue de plus de 70% l'import de leucine dans les cellules de drosophiles. L'effet des acides aminés aromatiques sur le transport de leucine est également différent entre les deux espèces, ceux-ci n'ayant que peu d'effet sur l'import de leucine chez la drosophile alors qu'ils diminuent de plus de 90% l'import de leucine dans les cellules humaines.

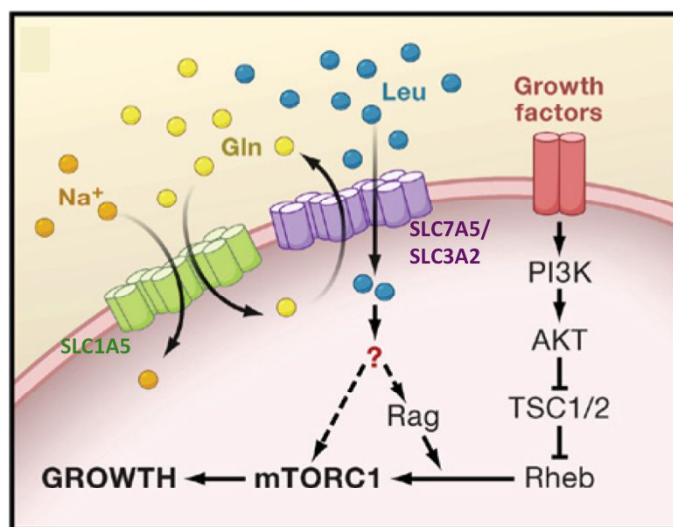
Les acides aminés perturbant le plus le transport de leucine chez la drosophile sont donc l'histidine et les acides aminés non chargés (à l'exception de la glycine). Des expériences de transport direct de ces acides aminés devront être réalisées sur des cellules S2 de drosophiles témoins et mutantes pour *mnd* (et pour *Jhl-21* afin de vérifier si une compensation du transport survient également). Ces expériences permettront de déterminer quels sont les autres acides aminés transportés par Mnd en plus de la leucine.



**Figure 103 : Effet de la présence de différents acides aminés sur la quantité de leucine importée par le système L dans des cellules humaines et de drosophiles**

Mesure de la quantité relative de leucine radiomarquée importée pendant 1 minute en absence de sodium (pour une concentration de leucine de 20  $\mu$ M) dans des cellules KB de carcinome épidermoïde oral humain et dans des cellules S2 embryonnaires de drosophiles en présence de 2 mM de différents acides aminés non radiomarqués. Les flèches indiquent les acides aminés ayant un effet opposé sur l'import de leucine entre les cellules humaines et de drosophiles (modifié d'après Yoon *et al.*, 2004).

L'identification des différents substrats de Mnd apportera des informations cruciales quant au rôle de Mnd dans le fonctionnement du système nerveux. Après avoir déterminé quels sont les acides aminés transportés par Mnd, il sera ensuite intéressant de chercher quelles sont les voies cellulaires mises en jeu. En tant que transporteur de leucine, Mnd pourrait par exemple être impliqué dans le fonctionnement du système nerveux au travers de la voie TOR. En effet, les acides aminés ramifiés transportés par les protéines du système L, tels que la leucine, interviennent dans l'activation de la voie TOR (Figure 104) (Dodd et Tee, 2012; Kurayama *et al.*, 2011; Nicklin *et al.*, 2009). Cette voie de signalisation cellulaire est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la croissance cellulaire, la synthèse de protéine, la régulation du métabolisme ou encore l'autophagie. La dérégulation de cette voie intervient dans de nombreuses pathologies dont plusieurs maladies neurologiques telles que l'épilepsie, l'autisme et différentes maladies neuro-dégénératives (Lipton et Sahin, 2014; Wong, 2014). La voie TOR intervient également dans la plasticité synaptique dépendante de la synthèse de protéine permettant la mémorisation et l'apprentissage (Graber *et al.*, 2013).

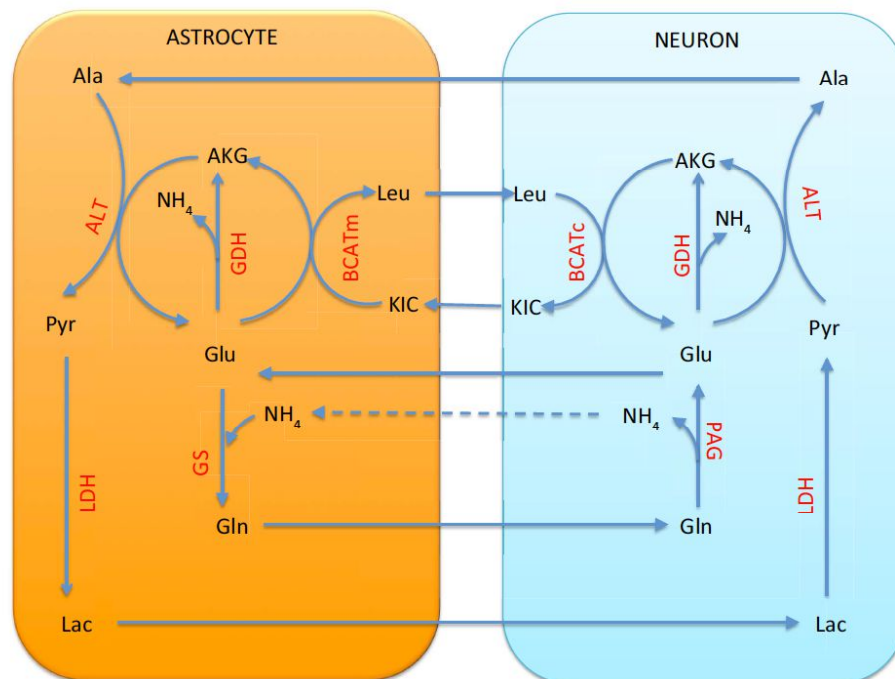


**Figure 104 : Activation de mTORC1 par l'import glutamine-dépendant de leucine**

La glutamine (Gln) est transportée dans les cellules par le transporteur sodium-dépendant SLC1A5 (en vert). La glutamine est ensuite utilisée pour l'import de leucine (Leu) par le transporteur SLC7A5/SLC3A2 (en violet). La leucine intracellulaire est détectée par un facteur inconnu qui active le complexe mTORC1 via l'ATPase Rag ou via une voie inconnue. Les facteurs de croissance activent mTORC1 via la voie PI3K-PDK1-AKT-TSC1/2-Rheb. Le complexe mTORC1 est donc activé en présence d'acides aminés, de facteur de croissance et d'énergie (non montré) (Cohen et Hall, 2009).

Mnd pourrait également intervenir dans le fonctionnement du système nerveux via le transport de leucine au travers du cycle des acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine). En effet, ce cycle semblerait intervenir dans la régulation du niveau de glutamate

(neurotransmetteur excitateur) dans le système nerveux (Figure 105) (Calvetti et Somersalo, 2013; Hutson *et al.*, 2001).



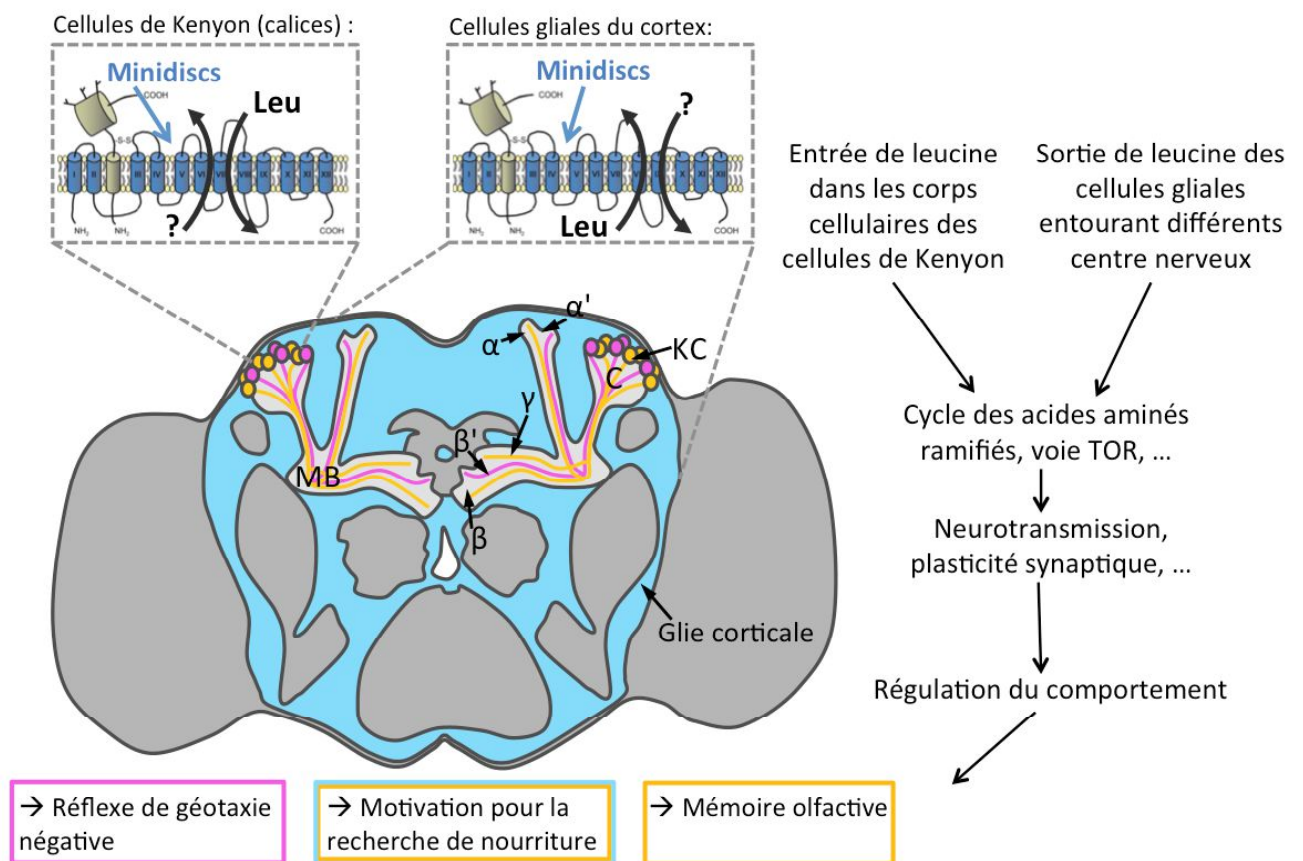
**Figure 105 : Implication du cycle des acides aminés ramifiés dans le métabolisme du glutamate au niveau du système nerveux central**

Le cycle des acides aminés branchés (ici la leucine a été prise comme exemple) fait intervenir la forme mitochondriale et la forme cytosolique de l'enzyme BCAT (Branched-Chain AminoTransferase). La forme mitochondriale de cette enzyme (BCATm) est localisée dans les cellules gliales et la forme cytosolique (BCATc) dans les neurones. Ces deux isoformes agissent de concert et permettent d'apporter l'azote nécessaire à la synthèse optimale de glutamate dans les neurones glutamatergiques à partir de l' $\alpha$ -kétoglutarate par transamination des acides aminés ramifiés. Ce cycle permettrait de servir d'alternative au cycle glutamate/glutamine qui nécessite le transport d'ammonium entre les neurones et les cellules gliales. Ala : Alanine ; Pyr : Pyruvate ; ALT : ALanine Transaminase ; NH<sub>4</sub> : Ammonium ; AKG :  $\alpha$ -KétoGlutarate ; Glu : Glutamate ; GDH : Glutamate DeHydrogenase ; BCATc : Branched-Chain AminoTransferase cytosolic ; BCATm : Branched-Chain AminoTransferase mitochondrial ; KIC :  $\alpha$ -KetoIsoCaproate ; Lac : Lactate ; LDH : Lactate DeHydrogenase ; Gln : Glutamine ; GS : Glutamine Synthetase ; PAG : Phosphate-Activated Glutaminase (Calvetti et Somersalo, 2013).

Des expériences d'imagerie calcique sur des cerveaux de drosophiles adultes pourraient permettre de déterminer si Mnd est directement impliqué dans le contrôle de l'activité nerveuse des cellules de Kenyon par exemple. Généralement, une augmentation de l'activité neuronale se traduit par une élévation de la concentration de calcium intracellulaire dans les neurones. Pour réaliser ces expériences, des drosophiles exprimant le senseur de calcium intracellulaire GCaMP dans les neurones des corps pédonculés pourraient être utilisées. L'indicateur calcique GCaMP est une protéine de fusion associant la GFP, la calmoduline et le peptide M13 (provenant d'une kinase) (Nakai *et al.*, 2001). Cette technique repose sur la capacité de la GCaMP à changer de conformation en présence

de calcium, ce qui augmente la fluorescence émise par la GFP portée par cet indicateur (Akerboom *et al.*, 2012). Lors de ces expériences, l'activité neuronale des corps pédonculés pourrait être étudiée en présence de différents acides aminés chez des drosophiles témoins et des drosophiles mutantes pour Mnd dans les corps pédonculés. Ces expériences pourraient permettre de déterminer si le rôle de Mnd dans le système nerveux est lié au transport de la leucine ou d'un autre substrat de Mnd.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence la localisation de Mnd dans le cerveau de drosophile et de lier sa présence dans le système nerveux central à son implication dans la modulation de certains comportements, tels que le réflexe de géotaxie négative. Ces résultats suggèrent donc que Mnd est probablement impliqué dans la régulation de l'activité neuronale (Figure 106).



**Figure 106 : Mode d'action hypothétique de Minidiscs dans le cerveau de drosophile expliquant son rôle dans la régulation du comportement**

La présence de Mnd dans le système nerveux central semble avoir un rôle dans le réflexe de géotaxie négative (lobes  $\alpha'/\beta'$  des corps pédonculés) et potentiellement dans la mémoire olfactive (lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés) et dans la motivation pour la recherche de nourriture (lobes  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$  des corps pédonculés et glie corticale). Mnd, en tant que transporteur de leucine, pourrait être impliqué dans la modulation de l'activité nerveuse à l'origine de ces différents comportements par l'intermédiaire de la voie TOR, du cycle des acides aminés ramifiés ou d'une autre voie cellulaire. MB: Corps Pédonculés; C: Calice;  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha'/\beta'$  et  $\gamma$ : Lobes des corps pédonculés; KC: Cellules de Kenyon; Leu: Leucine.

Aucune étude n'avait jusqu'à présent permis de mettre en évidence l'implication d'un transporteur du système L dans le fonctionnement du système nerveux. Bien que le rôle de la protéine LAT1 de mammifères dans le fonctionnement du système dopaminergique soit suspecté en raison de ses capacités de transport (LAT1 transporte la tyrosine et la L-DOPA qui sont les précurseurs de la dopamine ; Kageyama *et al.*, 2000), ce rôle n'a pas été démontré. Plusieurs études permettent d'établir un lien entre la mutation d'un transporteur d'acides aminés et l'apparition de différentes maladies neurologiques (Bridges *et al.*, 2012b; Ohtsuki *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2005). Cependant, d'importantes lacunes subsistent dans la compréhension des mécanismes cellulaires permettant à ces transporteurs d'intervenir dans le système nerveux. Les recherches visant à caractériser précisément le rôle des transporteurs d'acides aminés dans le système nerveux sont donc fondamentales pour comprendre leur fonctionnement physiologique et pathologique. Ces connaissances sont nécessaires pour mettre en place de nouvelles approches permettant de traiter et de prévenir les maladies neurologiques dans lesquels ces transporteurs sont impliqués.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abuin L., Bargeton B., Ulbrich M. H., Isacoff E. Y., Kellenberger S. et Benton R. (2011). Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. *Neuron*, **69**(1): 44-60. (doi:10.1016/j.neuron.2010.11.042)
- Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. a, Evans C. a, Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. a, Galle R. F., George R. a, Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. H., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Gabor G. L., Abril J. F., Agbayani a, An H. J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu a, Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V, Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. a, Butler H., Cadieu E., Center a, Chandra I, Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., de Pablos B., Delcher a, Deng Z., Mays a D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian a E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek a, Gong F., Gorrell J. H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston K. a, Howland T. J., Wei M. H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z., Kennison J. a, Ketchum K. a, Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky a a, Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N. V, Mobarry C., Morris J., Moshrefi a, Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. a, Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling a C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskaš R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang a H., Wang X., Wang Z. Y., Wassarman D. a, Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., WoodageT, Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. a, Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H. O., Gibbs R. a, Myers E. W., Rubin G. M. et Venter J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, **287**(5461): 2185-2195. (doi:10.1126/science.287.5461.2185)
- Akerboom J., Chen T.-W., Wardill T. J., Tian L., Marvin J. S., Mutlu S., Calderon N. C., Esposti F., Borghuis B. G., Sun X. R., Gordus a, Orger M. B., Portugues R., Engert F., Macklin J. J., Filosa a, Aggarwal a, Kerr R. a, Takagi R., Kracun S., Shigetomi E., Khakh B. S., Baier H., Lagnado L., Wang S. S.-H., Bargmann C. I., Kimmel B. E., Jayaraman V., Svoboda K., Kim D. S., Schreiter E. R. et Looger L. L. (2012). Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *Journal of Neuroscience*, **32**(40): 13819-13840. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012)
- Ambegaokar S. S., Roy B. et Jackson G. R. (2010). Neurodegenerative models in *Drosophila*: Polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, **40**(1): 29-39. (doi:10.1016/j.nbd.2010.05.026)
- Arriza J. L., Kavanaugh M. P., Fairman W. a, Wu Y. N., Murdoch G. H., North R. a et Amara S. G. (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *The Journal of biological chemistry*, **268**(21): 15329-15332.
- Aso Y., Grübel K., Busch S., Friedrich A. B., Siwanowicz I. et Tanimoto H. (2009). The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *Journal of neurogenetics*, **23**(1-2): 156-172. (doi:10.1080/01677060802471718)

- Aso Y., Herb A., Ogueta M., Siwanowicz I., Templier T., Friedrich A. B., Ito K., Scholz H. et Tanimoto H. (2012). Three Dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. ***PLoS Genetics***, **8(7)**. (doi:10.1371/journal.pgen.1002768)
- Augustin H., Grosjean Y., Chen K., Sheng Q. et Featherstone D. E. (2007). Nonvesicular release of glutamate by glial xCT transporters suppresses glutamate receptor clustering in vivo. ***The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience***, **27(1)**: 111-123. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4770-06.2007)
- Babu E., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Iribe Y., Tangtrongsup S., Jutabha P., Li Y., Ahmed N., Sakamoto S., Anzai N., Nagamori S. et Endou H. (2003). Identification of a Novel System L Amino Acid Transporter Structurally Distinct from Heterodimeric Amino Acid Transporters. ***Journal of Biological Chemistry***, **278(44)**: 43838-43845. (doi:10.1074/jbc.M305221200)
- Baker D. a, McFarland K., Lake R. W., Shen H., Tang X.-C., Toda S. et Kalivas P. W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. ***Nature neuroscience***, **6(7)**: 743-749. (doi:10.1038/nn1069)
- Barone M. C. et Bohmann D. (2013). Assessing neurodegenerative phenotypes in Drosophila dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining. ***Journal of visualized experiments: JoVE***, (74): e50339. (doi:10.3791/50339)
- Bassett A. R., Tibbit C., Ponting C. P. et Liu J.-L. (2014). Mutagenesis and homologous recombination in Drosophila cell lines using CRISPR/Cas9. ***Biology open***, **3(1)**: 42-9. (doi:10.1242/bio.20137120)
- Benton R., Sachse S., Michnick S. W. et Vosshall L. B. (2006). Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. ***PLoS Biology***, **4(2)**: 240-257. (doi:10.1371/journal.pbio.0040020)
- Benton R., Vannice K. S., Gomez-Diaz C. et Vosshall L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in Drosophila. ***Cell***, **136(1)**: 149-162. (doi:10.1016/j.cell.2008.12.001)
- Bergeron M. J., Simonin a., Bürzle M. et Hediger M. a. (2008). Inherited epithelial transporter disorders - An overview. ***Journal of Inherited Metabolic Disease***, **31(2)**: 178-187. (doi:10.1007/s10545-008-0861-6)
- Bicker G. (1998). No news from insect brains. ***Trends in Neurosciences***, **21(8)**: 349-355. (doi:10.1016/S0166-2236(98)01236-3)
- Bischof J., Maeda R. K., Hediger M., Karch F. et Basler K. (2007). An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, **104(9)**: 3312-3317. (doi:10.1073/pnas.0611511104)
- Bodoy S., Fotiadis D., Stoeger C., Kanai Y. et Palacín M. (2013). The small SLC43 family: Facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1. ***Molecular Aspects of Medicine***, **34(2-3)**: 638-645. (doi:10.1016/j.mam.2012.12.006)
- Bodoy S., Martín L., Zorzano A., Palacín M., Estévez R. et Bertran J. (2005). Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. ***Journal of Biological Chemistry***, **280(12)**: 12002-12011. (doi:10.1074/jbc.M408638200)

- Borsani G., Bassi M. T., Sperandio M. P., De Grandi a, Buoninconti a, Riboni M., Manzoni M., Incerti B., Pepe a, Andria G., Ballabio a et Sebastio G. (1999). SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nature genetics*, **21(3)**: 297-301. (doi:10.1038/6815)
- Böttcher R., Hollmann M., Merk K., Nitschko V., Obermaier C., Philippou-Massier J., Wieland I., Gaul U. et Förstemann K. (2014). Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured Drosophila cells. *Nucleic Acids Research*, **42(11)**. (doi:10.1093/nar/gku289)
- Bouzaiane E., Trannoy S., Scheunemann L., Plaçais P.-Y. et Preat T. (2015). Two Independent Mushroom Body Output Circuits Retrieve the Six Discrete Components of Drosophila Aversive Memory. *Cell Reports*, 1280-1292. (doi:10.1016/j.celrep.2015.04.044)
- Brand a H. et Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, **118(2)**: 401-415. (doi:10.1101/lm.1331809)
- Bridges R. J., Natale N. R. et Patel S. a. (2012a). System x<sub>c</sub> - cystine/glutamate antiporter: An update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British Journal of Pharmacology*, **165(1)**: 20-34. (doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x)
- Bridges R., Lutgen V., Lobner D. et Baker D. a. (2012b). Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc<sup>-</sup>) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacological reviews*, **64(3)**: 780-802. (doi:10.1124/pr.110.003889)
- Brody T., Yavatkar A. S., Kuzin A., Kundu M., Tyson L. J., Ross J., Lin T. Y., Lee C. H., Awasaki T., Lee T. et Odenwald W. F. (2012). Use of a Drosophila genome-wide conserved sequence database to identify functionally related cis-regulatory enhancers. *Developmental Dynamics*, **241(1)**: 169-189. (doi:10.1002/dvdy.22728)
- Bröer a, Wagner C., Lang F. et Bröer S. (2000). Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na<sup>+</sup> exchange and a substrate-gated anion conductance. *The Biochemical journal*, **346 Pt 3**: 705-710. (doi:10.1042/0264-6021:3460705)
- Bushey D. et Cirelli C. (2011). From genetics to structure to function: Exploring sleep in drosophila. *International Review of Neurobiology*, **99**: 213-244. (doi:10.1016/B978-0-12-387003-2.00009-4)
- Busto G. U., Cervantes-Sandoval I. et Davis R. L. (2010). Olfactory learning in Drosophila. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **25(6)**: 338-346. (doi:10.1152/physiol.00026.2010)
- Calonge M. J., Gasparini P., Chillaron J., Chillon M., Gallucci M., Rousaud F., Zelante L., Testar X., Dallapiccola B., Di Silverio F., Barceló P., Estivill X., Zorzano A., Nunes V. et Palacín M. (1994). Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nature genetics*, **6(4)**: 420-425.
- Calvetti D. et Somersalo E. (2013). Quantitative in silico analysis of neurotransmitter pathways under steady state conditions. *Frontiers in Endocrinology*, **4(October)**: 1-13. (doi:10.3389/fendo.2013.00137)
- Camargo S. M. R., Bockenbauer D. et Kleta R. (2008). Aminoacidurias: Clinical and molecular aspects. *Kidney international*, **73(8)**: 918-925. (doi:10.1038/sj.ki.5002790)



- Campbell W. a. et Thompson N. L. (2001). Overexpression of LAT1/CD98 Light Chain Is Sufficient to Increase System L-Amino Acid Transport Activity in Mouse Hepatocytes but Not Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, **276(20)**: 16877-16884. (doi:10.1074/jbc.M008248200)
- Cavener D. R. (1987). Volume 15 Number 2 1987 Nucleic Acids Research. *Nucleic Acids Research*, **15(2)**: 465-475.
- Cervantes-Sandoval I., Martin-Peña A., Berry J. a et Davis R. L. (2013). System-like consolidation of olfactory memories in Drosophila. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33(23)**: 9846-54. (doi:10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013)
- César-Razquin A., Snijder B., Frappier-Brinton T., Isserlin R., Gyimesi G., Bai X., Reithmeier R. A., Hepworth D., Hediger M. A., Edwards A. M. et Superti-Furga G. (2015). A Call for Systematic Research on Solute Carriers. *Cell*, **162(3)**: 478-487. (doi:10.1016/j.cell.2015.07.022)
- Chairoungdua A., Kanai Y., Matsuo H., Inatomi J., Kim D. K. et Endou H. (2001). Identification and Characterization of a Novel Member of the Heterodimeric Amino Acid Transporter Family Presumed to be Associated with an Unknown Heavy Chain. *Journal of Biological Chemistry*, **276(52)**: 49390-49399. (doi:10.1074/jbc.M107517200)
- Chen C.-C., Wu J.-K., Lin H.-W., Pai T.-P., Fu T.-F., Wu C.-L., Tully T. et Chiang a.-S. (2012). Visualizing Long-Term Memory Formation in Two Neurons of the Drosophila Brain. *Science*, **335(6069)**: 678-685. (doi:10.1126/science.1212735)
- Chillarón J., Estévez R., Mora C., Wagner C. a, Suessbrich H., Lang F., Gelpí J. L., Busch A. E., Zorzano A., Palacín M., Testar X. et Palaci M. (1996). Membranes and Bioenergetics : Obligatory Amino Acid Exchange via Systems b o , + -like and y + L-like : A TERTIARY ACTIVE TRANSPORT MECHANISM FOR RENAL REABSORPTION OF CYSTINE AND DIBASIC AMINO ACIDS. *The Journal of biological chemistry*, **271(30)**: 17761-17770. (doi:10.1074/jbc.271.30.17761)
- Closs E. I., Boissel J. P., Habermeier a. et Rotmann a. (2006). Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *Journal of Membrane Biology*, **213(2)**: 67-77. (doi:10.1007/s00232-006-0875-7)
- Cohen A. et Hall M. N. (2009). An Amino Acid Shuffle Activates mTORC1. *Cell*, **136(3)**: 399-400. (doi:10.1016/j.cell.2009.01.021)
- Conrad M. et Sato H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x<sub>c</sub><sup>-</sup>: Cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, **42(1)**: 231-246. (doi:10.1007/s00726-011-0867-5)
- Davis R. L. (2011). Traces of Drosophila Memory. *Neuron*, **70(1)**: 8-19. (doi:10.1016/j.neuron.2011.03.012.Traces)
- De Bundel D., Schallier A., Loyens E., Fernando R., Miyashita H., Van Liefferinge J., Vermoesen K., Bannai S., Sato H., Michotte Y., Smolders I. et Massie A. (2011). Loss of system x(c)- formula does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **31(15)**: 5792-5803. (doi:10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011)
- Dodd K. M. et Tee a. R. (2012). Leucine and mTORC1: a complex relationship. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, **302(11)**: E1329-E1342. (doi:10.1152/ajpendo.00525.2011)

- Dubrovsky E. B., Dubrovskaya V. a. et Berger E. M. (2002). Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**(11): 1555-1565. (doi:10.1016/S0965-1748(02)00076-0)
- Edwards T. N. et Meinertzhagen I. a. (2010). The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Progress in Neurobiology*, **90**(4): 471-497. (doi:10.1016/j.pneurobio.2010.01.001)
- Eroglu C. et Barres B. a. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, **468**(7321): 223-231. (doi:10.1038/nature09612)
- Farris S. M. (2011). Are mushroom bodies cerebellum-like structures? *Arthropod Structure and Development*, **40**(4): 368-379. (doi:10.1016/j.asd.2011.02.004)
- Featherstone D. E. (2011). Glial solute carrier transporters in *Drosophila* and mice. *Glia*, **59**(9): 1351-1363. (doi:10.1002/glia.21085)
- Feliubadaló L., Font M., Purroy J., Rousaud F., Estivill X., Nunes V., Golomb E., Centola M., Aksentijevich I., Kreiss Y., Goldman B., Pras M., Kastner D. L., Pras E., Gasparini P., Bisceglia L., Beccia E., Gallucci M., de Sanctis L., Ponzone a, Rizzoni G. F., Zelante L., Bassi M. T., George a L., Manzoni M., De Grandi a, Riboni M., Endsley J. K., Ballabio a, Borsani G., Reig N., Fernández E., Estévez R., Pineda M., Torrents D., Camps M., Lloberas J., Zorzano a et Palacín M. (1999). Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. *Nature genetics*, **23**(1): 52-57. (doi:10.1038/12652)
- Fenczik C. a., Zent R., Dellos M., Calderwood D. a., Satriano J., Kelly C. et Ginsberg M. H. (2001). Distinct Domains of CD98hc Regulate Integrins and Amino Acid Transport. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(12): 8746-8752. (doi:10.1074/jbc.M011239200)
- Fernández E., Carrascal M., Rousaud F., Abián J., Zorzano A., Palaci M. et Chillarón J. (2002). rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am J Physiol Renal*, **283**: 540-548. (doi:10.1152/ajprenal.00071.2002)
- Fernández E., Jiménez-Vidal M., Calvo M., Zorzano A., Tebar F., Palacín M. et Chillarón J. (2006). The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters: The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the heteromeric amino acid transporters. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(36): 26552-26561. (doi:10.1074/jbc.M604049200)
- Fernández E., Torrents D., Zorzano A., Palacín M. et Chillarón J. (2005). Identification and functional characterization of a novel low affinity aromatic-preferring amino acid transporter (arpAT). One of the few proteins silenced during primate evolution. *The Journal of biological chemistry*, **280**(19): 19364-19372. (doi:10.1074/jbc.M412516200)
- Fort J., De La Ballina L. R., Burghardt H. E., Ferrer-Costa C., Turnay J., Ferrer-Orta C., Usón I., Zorzano A., Fernández-Recio J., Orozco M., Lizarbe M. A., Fita I. et Palacín M. (2007). The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **282**(43): 31444-31452. (doi:10.1074/jbc.M704524200)
- Fotiadis D., Kanai Y. et Palacín M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**(2-3): 139-158. (doi:10.1016/j.mam.2012.10.007)
- Fredriksson R., Nordström K. J. V., Stephansson O., Hägglund M. G. a et Schiöth H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Letters*, **582**(27): 3811-3816. (doi:10.1016/j.febslet.2008.10.016)

- Freeman M. R. et Doherty J. (2006). Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. ***Trends in Neurosciences***, **29**(2): 82-90. (doi:10.1016/j.tins.2005.12.002)
- Fukasawa Y., Segawa H., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Matsuo H., Cha S. H., Endou H. et Kanai Y. (2000). Identification and Characterization of a Na<sup>+</sup>-independent Neutral Amino Acid Transporter That Associates with the 4F2 Heavy Chain and Exhibits Substrate Selectivity for Small Neutral D- and L-Amino Acids \*. ***The Journal of biological chemistry***, **275**(13): 9690-9698.
- Gabriško M. et Janeček Š. (2009). Looking for the ancestry of the heavy-chain subunits of heteromeric amino acid transporters rBAT and 4F2hc within the GH13  $\alpha$ -amylase family. ***FEBS Journal***, **276**(24): 7265-7278. (doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07434.x)
- Ghosh A., Manrique-Hoyos N., Voigt A., Schulz J. B., Kreutzfeldt M., Merkler D. et Simons M. (2011). Targeted ablation of oligodendrocytes triggers axonal damage. ***PLoS ONE***, **6**(7): 1-10. (doi:10.1371/journal.pone.0022735)
- Graber T. E., McCamphill P. K. et Sossin W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. ***Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)***, **20**(10): 518-30. (doi:10.1101/lm.027664.112)
- Green E. W., Fedele G., Giorgini F. et Kyriacou C. P. (2014). A *Drosophila* RNAi collection is subject to dominant phenotypic effects. ***Nature Methods***, **11**(3): 222-223. (doi:10.1038/nmeth.2856)
- Grosjean Y., Grillet M., Augustin H., Ferveur J.-F. et Featherstone D. E. (2008). A glial amino-acid transporter controls synapse strength and courtship in *Drosophila*. ***Nature neuroscience***, **11**(1): 54-61. (doi:10.1038/nn2019)
- Güven-Ozkan T. et Davis R. L. (2014). Functional neuroanatomy of *Drosophila* olfactory memory formation. ***Learning & Memory***, **21**(10): 519-526. (doi:10.1101/lm.034363.114)
- Hahn M. K. et Blakely R. D. (2007). The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. ***Annual review of pharmacology and toxicology***, **47**: 401-441. (doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105242)
- Halassa M. M. et Haydon P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. ***Annual review of physiology***, **72**: 335-355. (doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135843)
- Haydon P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. ***Nature reviews. Neuroscience***, **2**(3): 185-193. (doi:10.1038/35058528)
- Hediger M. a., Clémentçon B., Burrier R. E. et Bruford E. a. (2013). The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. ***Molecular Aspects of Medicine***, **34**(2-3): 95-107. (doi:10.1016/j.mam.2012.12.009)
- Hediger M. a., Romero M. F., Peng J. B., Rolfs A., Takanaga H. et Bruford E. a. (2004). The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. ***Pflügers Archiv European Journal of Physiology***, **447**(5): 465-468. (doi:10.1007/s00424-003-1192-y)
- Heisenberg M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. ***Nature reviews. Neuroscience***, **4**(4): 266-275. (doi:10.1038/nrn1074)

- Hutson S. M., Lieth E. et Lanoue K. F. (2001). Symposium : Leucine as a Nutritional Signal Function of Leucine in Excitatory Neurotransmitter Metabolism in the Central Nervous System. ***The Journal of nutrition***, **131(3)**: 846-850.
- Iijima K. et Iijima-Ando K. (2008). Drosophila models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. ***Journal of Alzheimer's disease : JAD***, **15(4)**: 523-540.
- Inlow J. K. et Restifo L. L. (2004). Molecular and Comparative Genetics of Mental Retardation. ***Genetics***, **166(2)**: 835-881. (doi:10.1534/genetics.166.2.835)
- Janpipatkul K., Suksen K., Borwornpinyo S., Jearawiriyapaisarn N., Hongeng S., Piyachaturawat P. et Chairoungdua A. (2014). Downregulation of LAT1 expression suppresses cholangiocarcinoma cell invasion and migration. ***Cellular Signalling***, **26(8)**: 1668-1679. (doi:10.1016/j.cellsig.2014.04.002)
- Jefferis G. S. X. E., Potter C. J., Chan A. M., Marin E. C., Rohlffing T., Maurer C. R. et Luo L. (2007). Comprehensive Maps of Drosophila Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. ***Cell***, **128(6)**: 1187-1203. (doi:10.1016/j.cell.2007.01.040)
- Kageyama T., Nakamura M., Matsuo A. et Yamasaki Y. (2000). The 4F2hc / LAT1 complex transports L-DOPA across the blood – brain barrier. ***Brain Research***, **879**: 115-121.
- Kanai Y., Cl emen on B., Simonin A., Leuenberger M., Lochner M., Weisstanner M. et Hediger M. a. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. ***Molecular Aspects of Medicine***, **34(2-3)**: 108-120. (doi:10.1016/j.mam.2013.01.001)
- Kanai Y. et Endou H. (2001). Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. ***Curr Drug Metab***, **2(4)**: 339-354.
- Kanai Y., Fukasawa Y., Cha S. H., Segawa H., Chairoungdua A., Kim D. K., Matsuo H., Kim J. Y., Miyamoto K. I., Takeda E. et Endou H. (2000). Transport properties of a system y+L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition. ***Journal of Biological Chemistry***, **275(27)**: 20787-20793. (doi:10.1074/jbc.M000634200)
- Keene A. C., Stratmann M., Keller A., Perrat P. N., Vosshall L. B. et Waddell S. (2004). Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. ***Neuron***, **44(3)**: 521-533. (doi:10.1016/j.neuron.2004.10.006)
- Kettenmann H., Kirchhoff F. et Verkhratsky A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. ***Neuron***, **77(1)**: 10-18. (doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023)
- Kim D. K., Kanai Y., Choi H. W., Tangtrongsup S., Chairoungdua A., Babu E., Tachampa K., Anzai N., Iribe Y. et Endou H. (2002). Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. ***Biochimica et biophysica acta***, **1565(1)**: 112-121. (doi:10.1016/S0005-2736(02)00516-3)
- Kurayama R., Ito N., Nishibori Y., Fukuhara D., Akimoto Y., Higashihara E., Ishigaki Y., Sai Y., Miyamoto K., Endou H., Kanai Y. et Yan K. (2011). Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. ***Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology***, **91(7)**: 992-1006. (doi:10.1038/labinvest.2011.43)

- Larsson M. C., Domingos A. I., Jones W. D., Chiappe M. E., Amrein H. et Vosshall L. B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, **43**(5): 703-714. (doi:10.1016/j.neuron.2004.08.019)
- Lee W. T. (2011). Disorders of amino acid metabolism associated with epilepsy. *Brain and Development*, **33**(9): 745-752. (doi:10.1016/j.braindev.2011.06.014)
- Lin S., Huang Y. et Lee T. (2009). Nuclear receptor unfulfilled regulates axonal guidance and cell identity of *Drosophila* mushroom body neurons. *PLoS ONE*, **4**(12). (doi:10.1371/journal.pone.0008392)
- Lipton J. O. et Sahin M. (2014). The Neurology of mTOR. *Neuron*, **84**(2): 275-291. (doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034)
- Littleton J. T. et Ganetzky B. (2000). Ion Channels and Synaptic Organization: Analysis of the *Drosophila* Genome. *Neuron*, **26**(0896-6273 SB - M): 35-43. (doi:10.1016/S0896-6273(00)81135-6)
- Liu X. et Davis R. L. (2009). The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nature neuroscience*, **12**(1): 53-59. (doi:10.1038/nn.2235)
- Mackenzie B. et Erickson J. D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, **447**(5): 784-795. (doi:10.1007/s00424-003-1117-9)
- Malik B. R. et Hodge J. J. L. (2014). *Drosophila* Adult Olfactory Shock Learning. *Journal of Visualized Experiments*, (90): 1-6. (doi:10.3791/50107)
- Mao Z. et Davis R. L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in neural circuits*, **3**(July): 5. (doi:10.3389/neuro.04.005.2009)
- Martin J. F., Hersperger E., Simcox A. et Shearn A. (2000). Minidiscs Encodes a Putative Amino Acid Transporter Subunit Required Non-Autonomously for Imaginal Cell Proliferation. *Mechanisms of Development*, **92**(2): 155-167. (doi:10.1016/S0925-4773(99)00338-X)
- Martin J.-R., Ernst R. et Heisenberg M. (1998). Mushroom Bodies Suppress Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory*, **5**(1): 179-191. (doi:10.1101/lm.5.1.179)
- Mastroberardino L., Spindler B., Pfeiffer R., Skelly P. J., Loffing J., Shoemaker C. B. et Verrey F. (1998). Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*, **395**(6699): 288-291. (doi:10.1038/26246)
- Matsuno M., Horiuchi J., Yuasa Y., Ofusa K., Miyashita T., Masuda T. et Saitoe M. (2015). Long-Term Memory Formation in *Drosophila* Requires Training-Dependent Glial Transcription. *Journal of Neuroscience*, **35**(14): 5557-5565. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3865-14.2015)
- Matsuo H., Kanai Y., Kim J. Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Inatomi J., Shigeta Y., Ishimine H., Chaekuntode S., Tachampa K., Choi H. W., Babu E., Fukuda J. et Endou H. (2002). Identification of a novel Na<sup>+</sup>-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(23): 21017-21026. (doi:10.1074/jbc.M200019200)

- Mehren J. E., Ejima A. et Griffith L. C. (2004). Unconventional sex: Fresh approaches to courtship learning. *Current Opinion in Neurobiology*, **14**(6): 745-750. (doi:10.1016/j.conb.2004.10.012)
- Meier C., Ristic Z., Verrey É. et Klauser S. (2002). Activation of system L heterodimer amino acid exchangers by intercellular substrates. *EMBO Journal*, **21**(4): 580-589.
- Melendez R. I., Vuthiganon J. et Kalivas P. W. (2005). Regulation of extracellular glutamate in the prefrontal cortex: focus on the cystine glutamate exchanger and group I metabotropic glutamate receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **314**(1): 139-147. (doi:10.1124/jpet.104.081521)
- Nakai J., Ohkura M. et Imoto K. (2001). A high signal-to-noise Ca<sup>2+</sup> probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, **19**(2): 137-41. (doi:10.1038/84397)
- Nakauchi J., Matsuo H., Kyung D., Goto A., Chairoungdua A., Ho S., Inatomi J., Shiokawa Y., Yamaguchi K., Saito I., Endou H. et Kanai Y. (2000). Cloning and characterization of a human brain Na<sup>+</sup>-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neuroscience Letters*, **287**: 231-235.
- Newman E. a. (2003). New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, **26**(10): 536-542. (doi:10.1016/S0166-2236(03)00237-6)
- Nicklin P., Bergman P., Zhang B., Triantafellow E., Wang H., Nyfeler B., Yang H., Hild M., Kung C., Wilson C., Myer V. E., MacKeigan J. P., Porter J. a., Wang Y. K., Cantley L. C., Finan P. M. et Murphy L. O. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*, **136**(3): 521-534. (doi:10.1016/j.cell.2008.11.044)
- O'Kane C. J. (2011). Drosophila as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. *Curr Top Behav Neurosci*, **7**: 37-60. (doi:10.1007/7854)
- Oda K., Hosoda N., Endo H., Saito K., Tsujihara K., Yamamura M., Sakata T., Anzai N., Wempe M. F., Kanai Y. et Endou H. (2010). L-Type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Science*, **101**(1): 173-179. (doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01386.x)
- Ohtsuki S., Yamaguchi H., Kang Y.-S., Hori S. et Terasaki T. (2010). Reduction of L-Type Amino Acid Transporter 1 mRNA Expression in Brain Capillaries in a Mouse Model of Parkinson ' s Disease. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **33**(7): 1250-1252. (doi:JST.JSTAGE/bpb/33.1250)
- Palacín M., Nunes V., Font-Llitjós M., Jiménez-Vidal M., Fort J., Gasol E., Pineda M., Feliubadaló L., Chillarón J. et Zorzano A. (2005). The genetics of heteromeric amino acid transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **20**: 112-124. (doi:10.1152/physiol.00051.2004)
- Palmieri F. (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1777**(7-8): 564-578. (doi:10.1016/j.bbabi.2008.03.008)
- Palmieri F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**(2-3): 465-484. (doi:10.1016/j.mam.2012.05.005)
- Pan Y., Zhou Y., Guo C., Gong H., Gong Z. et Liu L. (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in Drosophila visual pattern memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, **16**(5): 289-295. (doi:10.1101/lm.1331809)

- Parker L., Howlett I. C., Rusan Z. M. et Tanouye M. a. (2011). Seizure and epilepsy: Studies of seizure disorders in drosophila. *International Review of Neurobiology*, **99**: 1-21. (doi:10.1016/B978-0-12-387003-2.00001-X)
- Parker R. J. et Auld V. J. (2006). Roles of glia in the Drosophila nervous system. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **17(1)**: 66-77. (doi:10.1016/j.semcdb.2005.11.012)
- Parks A. L., Cook K. R., Belvin M., Dompe N. a, Fawcett R., Huppert K., Tan L. R., Winter C. G., Bogart K. P., Deal J. E., Deal-Herr M. E., Grant D., Marcinko M., Miyazaki W. Y., Robertson S., Shaw K. J., Tabios M., Vysotskaia V., Zhao L., Andrade R. S., Edgar K. a, Howie E., Killpack K., Milash B., Norton A., Thao D., Whittaker K., Winner M. a, Friedman L., Margolis J., Singer M. a, Kopczynski C., Curtis D., Kaufman T. C., Plowman G. D., Duyk G. et Francis-Lang H. L. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nature genetics*, **36(3)**: 288-292. (doi:10.1038/ng1312)
- Patel S. a, Warren B. a, Rhoderick J. F. et Bridges R. J. (2004). Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc<sup>-</sup>: An obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology*, **46(2)**: 273-284. (doi:10.1016/j.neuropharm.2003.08.006)
- Pereanu W., Spindler S., Im E., Buu N. et Hartenstein V. (2007). The Emergence of Patterned Movement During Late Embryogenesis of Drosophila. *Developmental neurobiology*, **67(5)**: 1669-1685. (doi:10.1002/dneu)
- Pfeiffer B. D., Ngo T. T. B., Hibbard K. L., Murphy C., Jenett A., Truman J. W. et Rubin G. M. (2010). Refinement of tools for targeted gene expression in Drosophila. *Genetics*, **186(2)**: 735-755. (doi:10.1534/genetics.110.119917)
- Pfeiffer R., Rossier G., Spindler B., Meier C., Kühn L. et Verrey F. (1999). Amino acid transport of y<sup>+</sup>L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO Journal*, **18(1)**: 49-57. (doi:10.1093/emboj/18.1.49)
- Pitman J. L., DasGupta S., Krashes M. J., Leung B., Perrat P. N. et Waddell S. (2009). There are many ways to train a fly. *Fly (Austin)*, **3(1)**: 3-9. (doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02497.x.Plasma)
- Piyankarage S. C., Augustin H., Featherstone D. E. et Shippy S. a. (2010). Hemolymph amino acid variations following behavioral and genetic changes in individual Drosophila larvae. *Amino Acids*, **38(3)**: 779-788. (doi:10.1007/s00726-009-0284-1)
- Piyankarage S. C., Augustin H., Grosjean Y., Featherstone D. E. et Shippy S. a. (2008). Hemolymph amino acid analysis of individual Drosophila larvae. *Anal Chem*, **80(4)**: 1201-1207. (doi:10.1021/ac701785z)
- Plaçais P. Y., Trannoy S., Friedrich A. B., Tanimoto H. et Preat T. (2013). Two pairs of mushroom body efferent neurons are required for appetitive long-term memory retrieval in drosophila. *Cell Reports*, **5(3)**: 769-780. (doi:10.1016/j.celrep.2013.09.032)
- Prager G. W., Féral C. C., Kim C., Han J. et Ginsberg M. H. (2007). CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin  $\beta$  subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **282(33)**: 24477-24484. (doi:10.1074/jbc.M702877200)
- Pramod A. B., Foster J., Carvelli L. et Henry L. K. (2013). SLC6 Transporters: Structure, Function, Regulation, Disease Association and Therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine*, **34(2-3)**: 197-219. (doi:10.1016/j.mam.2012.07.002.SLC6)

- Qin H., Cressy M., Li W., Coravos J. S., Izzi S. a. et Dubnau J. (2012). Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in drosophila. ***Current Biology***, **22(7)**: 608-614. (doi:10.1016/j.cub.2012.02.014)
- Quinn W. G., Harris W. A. et Benzer S. (1974). Conditioned Behavior in *Drosophila melanogaster*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, **71(3)**: 708-712.
- Reimer R. J. (2014). SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. ***Molecular Aspects of Medicine***, **34(0)**: 350-359. (doi:10.1016/j.mam.2012.05.004.SLC17)
- Reimer R. J. et Edwards R. H. (2004). Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. ***Pflugers Archiv European Journal of Physiology***, **447(5)**: 629-635. (doi:10.1007/s00424-003-1087-y)
- Reynolds B., Roversi P., Laynes R., Kazi S., Boyd C. a R. et Goberdhan D. C. I. (2009). *Drosophila* expresses a CD98 transporter with an evolutionarily conserved structure and amino acid-transport properties. ***The Biochemical journal***, **420(3)**: 363-372. (doi:10.1042/BJ20082198)
- Riddiford L. M., Truman J. W., Mirth C. K. et Shen Y.-C. (2010). A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. ***Development (Cambridge, England)***, **137(7)**: 1117-1126. (doi:10.1242/dev.037218)
- Riemensperger T., Issa A. R., Pech U., Coulom H., Nguyễn M. V., Cassar M., Jacquet M., Fiala A. et Birman S. (2013). A Single Dopamine Pathway Underlies Progressive Locomotor Deficits in a *Drosophila* Model of Parkinson Disease. ***Cell Reports***, **5(4)**: 952-960. (doi:10.1016/j.celrep.2013.10.032)
- Ritchie R. J. et Prvan T. (1996). Current Statistical Methods for Estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten Kinetics. ***Biochemical Education***, **24(4)**: 196-206.
- Robinow S. et White K. (1988). The locus elav of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. ***Developmental biology***, **126(2)**: 294-303. (doi:10.1016/0012-1606(88)90139-X)
- Rosenberg D., Artoul S., Segal A. C., Kolodney G., Radzishevsky I., Dikopoltsev E., Foltyn V. N., Inoue R., Mori H., Billard J.-M. et Wolosker H. (2013). Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. ***The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience***, **33(8)**: 3533-44. (doi:10.1523/JNEUROSCI.3836-12.2013)
- Rosilio C., Nebout M., Imbert V., Griessinger E., Neffati Z., Benadiba J., Hagenbeek T., Spits H., Reverso J., Ambrosetti D., Michiels J.-F., Bailly-Maitre B., Endou H., Wempe M. F. et Peyron J.-F. (2015). L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): a therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia. ***Leukemia***, **29(6)**: 1253-1266. (doi:10.1038/leu.2014.338)
- Rossier G., Meier C., Bauch C., Summa V., Sordat B., Verrey F. et Kühn L. C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. ***Journal of Biological Chemistry***, **274(49)**: 34948-34954. (doi:10.1074/jbc.274.49.34948)
- Rozas J. L., Gómez-Sánchez L., Tomás-Zapico C., Lucas J. J. et Fernández-Chacón R. (2010). Presynaptic dysfunction in Huntington's disease. ***Biochemical Society transactions***, **38(2)**: 488-492. (doi:10.1042/BST0380488)



- Rubin G. M., Yandell M. D., Wortman J. R., Miklos G. L. G., Nelson C. R., Hariharan I. K., Fortini M. E., Li P. W., Apweiler R., Fleischmann W., Cherry J. M., Henikoff S., Skupski M. P., Ashburner M., Birney E., Boguski M. S., Brody T., Celniker S. E., Chervitz S. A., Coates D., Cravchik A., Gabrielian A., Galle R. F., Gelbart W. M., George R. A., Goldstein S. B., Gong F., Guan P., Harris N. L., Hay B. A., Hoskins A., Li J., Li Z., Hynes R. O., Jones S. J. M., Peter M., Lemaitre B., Littleton J. T., Morrison D. K., Mungall C., Zhao Q., Zheng X. H., Zhong F., Zhong W., Gibbs R., Venter C., Adams M. D. et Lewis S. (2000). Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science*, **287**(5461): 2204-2215.
- Sakai T. et Kitamoto T. (2006). Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. *Journal of Neurobiology*, **66**(8): 821-834. (doi:10.1002/neu)
- Sakurai M., Aoki T., Yoshikawa S., Santschi L. a, Saito H., Endo K., Ishikawa K., Kimura K., Ito K., Thomas J. B. et Hama C. (2009). Differentially expressed Drl and Drl-2 play opposing roles in Wnt5 signaling during *Drosophila* olfactory system development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**(15): 4972-4980. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2821-08.2009)
- Saleh M.-C., van Rij R. P., Hekele A., Gillis A., Foley E., O'Farrell P. H. et Andino R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology*, **8**(8): 793-802. (doi:10.1038/ncb1439)
- Sánchez-Soriano N., Tear G., Whittington P. et Prokop A. (2007). *Drosophila* as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. *Neural development*, **2**: 9. (doi:10.1186/1749-8104-2-9)
- Sato H., Tamba M., Ishii T. et Bannai S. (1999). Cloning and Expression of a Plasma Membrane Cystine / Glutamate Exchange Transporter Composed of Two Distinct Proteins. *Biochemistry*, 2-5. (doi:10.1074/jbc.274.17.11455)
- Sato K., Pellegrino M., Nakagawa T., Nakagawa T., Vosshall L. B. et Touhara K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, **452**(7190): 1002-1006. (doi:10.1038/nature06850)
- Schiöth H. B., Roshanbin S., Hägglund M. G. a et Fredriksson R. (2013). Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**(2-3): 571-585. (doi:10.1016/j.mam.2012.07.012)
- Schneider I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, **27**(2): 353-365. (doi:VL - 27)
- Séjourné J., Plaçais P.-Y., Aso Y., Siwanowicz I., Trannoy S., Thoma V., Tedjakumala S. R., Rubin G. M., Tchénio P., Ito K., Isabel G., Tanimoto H. et Preat T. (2011). Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nature neuroscience*, **14**(7): 903-910. (doi:10.1038/nn.2846)
- Serway C., Kaufman R., Strauss R. et de Belle J. (2009). Mushroom bodies enhance initial motor activity in *Drosophila*. *J Neurogenet*, **23**(1-2): 173-184. (doi:10.1080/01677060802572895)
- Shafqat S., Tamarappoo B. K., Kilberg M. S., Puranam R. S., McNamara J. O., Guadaño-Ferraz A. et Fremeau R. T. (1993). Cloning and expression of a novel Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na<sup>+</sup>/glutamate cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(21): 15351-15355.

- Simonnet M. M., Berthelot-Grosjean M. et Grosjean Y. (2014). Testing Drosophila Olfaction with a Y-maze Assay. *Journal of Visualized Experiments*, **(88)**: 9-12. (doi:10.3791/51241)
- Sourdot F. (2014). *Etude de l'expression et du rôle d'une chaîne lourde de transporteur d'acides aminés, CD98hc, chez Drosophila melanogaster (Rapport de stage de Master 2 Recherche)*.
- Spehr M. et Munger S. D. (2009). Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *Journal of Neurochemistry*, **109(6)**: 1570-1583. (doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06085.x)
- Strauss R. (2002). The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current Opinion in Neurobiology*, **12(6)**: 633-638. (doi:10.1016/S0959-4388(02)00385-9)
- Strauss R. et Heisenberg M. (1993). A higher control center of locomotor behavior in the Drosophila brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **13(5)**: 1852-1861.
- Strutz A., Soelter J., Baschwitz A., Farhan A., Grabe V., Rybak J., Knaden M., Schmucker M., Hansson B. S. et Sachse S. (2014). Decoding odor quality and intensity in the Drosophila brain. *eLife*, **3**: 1-21. (doi:10.7554/eLife.04147)
- Tempel B. L., Bonini N., Dawson D. R. et Quinn W. G. (1983). Reward learning in normal and mutant Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80(5)**: 1482-1486. (doi:10.1073/pnas.80.5.1482)
- Tomi M., Mori M., Tachikawa M., Katayama K., Terasaki T. et Hosoya K. I. (2005). L-type amino acid transporter 1-mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **46(7)**: 2522-2530. (doi:10.1167/iovs.04-1175)
- Torrents D., Mykkänen J., Pineda M., Feliubadaló L., Estévez R., de Cid R., Sanjurjo P., Zorzano a, Nunes V., Huoponen K., Reinikainen a, Simell O., Savontaus M. L., Aula P. et Palacín M. (1999). Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nature genetics*, **21(3)**: 293-296. (doi:10.1038/6809)
- Torrents D., Pineda M., Ferna E., Lloberas J., Shi Y., Zorzano A. et Palaci M. (1998). Identification and Characterization of a Membrane Protein ( y+L Amino Acid Transporter-1 ) That Associates with 4F2hc to Encode the Amino Acid Transport Activity y+L. *The Journal of Biological Chemistry*, **273(49)**: 32437-32445. (doi:10.1074/jbc.273.49.32437)
- Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K. K., Hansen K. B., Yuan H., Myers S. J. et Dingledine R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, **62(3)**: 405-496. (doi:10.1124/pr.109.002451)
- Ulvila J., Parikka M., Kleino A., Sormunen R., Ezekowitz R. A., Kocks C. et Rämetsä M. (2006). Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in Drosophila S2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **281(20)**: 14370-14375. (doi:10.1074/jbc.M513868200)
- Verrey F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **445(5)**: 529-533. (doi:10.1007/s00424-002-0973-z)
- Verrey F., Closs E. I., Wagner C. a., Palacin M., Endou H. et Kanai Y. (2004). CATs and HATs: The SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, **447(5)**: 532-542. (doi:10.1007/s00424-003-1086-z)

- Vömel M. et Wegener C. (2008). Neuroarchitecture of aminergic systems in the larval ventral ganglion of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, **3**(3). (doi:10.1371/journal.pone.0001848)
- Vosshall L. B., Amrein H., Morozov P. S., Rzhetsky a et Axel R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, **96**(5): 725-736. (doi:10.1016/S0092-8674(00)80582-6)
- Vosshall L. B. et Stocker R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual review of neuroscience*, **30**: 505-533. (doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306)
- Waddell S. (2011). Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends in Neurosciences*, **33**(10): 457-464. (doi:10.1016/j.tins.2010.07.001.Dopamine)
- Wang Y., Chiang A. S., Xia S., Kitamoto T., Tully T. et Zhong Y. (2003). Blockade of Neurotransmission in *Drosophila* Mushroom Bodies Impairs Odor Attraction, but Not Repulsion. *Current Biology*, **13**(21): 1900-1904. (doi:10.1016/j.cub.2003.10.003)
- Wang Y., Mamiya A., Chiang A. et Zhong Y. (2008). Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**(17): 4368-4376. (doi:10.1523/JNEUROSCI.2958-07.2008)
- White K. E., Humphrey D. M. et Hirth F. (2010). The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Frontiers in Neuroscience*, **4**(205): 1-12. (doi:10.3389/fnins.2010.00205)
- White M. F. et Christensen H. N. (1982). Cationic Amino Acid Transport into Cultured Animal Cells. *The Journal of biological chemistry*, **257**(8): 4450-4457.
- Whitlock K. E. (1993). Development of *Drosophila* wing sensory neurons in mutants with missing or modified cell surface molecules. *Development (Cambridge, England)*, **117**(4): 1251-1260.
- Williams L. E. et Featherstone D. E. (2014). Regulation of Hippocampal Synaptic Strength by Glial xCT. *Journal of Neuroscience*, **34**(48): 16093-16102. (doi:10.1523/JNEUROSCI.1267-14.2014)
- Wolff T., Lyer N. A. et Rubin G. M. (2014). Neuroarchitecture and neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: A GAL4-based dissection of protocerebral bridge neurons and circuits. *Journal of Comparative Neurology*, **523**(7): 997-1037. (doi:10.1002/cne.23705)
- Wong M. (2014). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathways in Neurological Diseases. *Biomed J.*, **36**(2): 1-17. (doi:10.4103/2319-4170.110365.Mammalian)
- Worby C. a, Simonson-Leff N. et Dixon J. E. (2001). RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured *Drosophila* cells. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, **2001**(95): pl1. (doi:10.1126/stke.2001.95.pl1)
- Xie X., Dumas T., Tang L., Brennan T., Reeder T., Thomas W., Klein R. D., Flores J., O'Hara B. F., Heller H. C. et Franken P. (2005). Lack of the alanine-serine-cysteine transporter 1 causes tremors, seizures, and early postnatal death in mice. *Brain Research*, **1052**(2): 212-221. (doi:10.1016/j.brainres.2005.06.039)
- Xiong W.-C., Okano H., Patel N. H., Blendy J. A. et Montell C. (1994). Encodes a Glial-Specific Homeo Domain Protein Required in the. *Genes & Development*, **8**: 981-994.

- Yanagida O., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D. K., Segawa H., Nii T., Cha S. H., Matsuo H., Fukushima J., Fukasawa Y., Tani Y., Taketani Y., Uchino H., Kim J. Y., Inatomi J., Okayasu I., Miyamoto K., Takeda E., Goya T. et Endou H. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica et biophysica acta*, **1514**(2): 291-302. (doi:10.1016/S0005-2736(01)00384-4)
- Yoon J. H., Kim Y. B., Kim M. S., Park J. C., Kook J. K., Jung H. M., Kim S. G., Yoo H., Ko Y. M., Lee S. H., Kim B. Y., Chun H. S., Kanai Y., Endou H. et Kim D. K. (2004). Expression and functional characterization of the system L amino acid transporter in KB human oral epidermoid carcinoma cells. *Cancer Letters*, **205**(2): 215-226. (doi:10.1016/j.canlet.2003.10.009)
- Zars T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**(6): 790-795. (doi:10.1016/S0959-4388(00)00147-1)
- Zerangue N. et Kavanaugh M. P. (1996). ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *The Journal of biological chemistry*, **271**(45): 27991-27994. (doi:10.1074/jbc.271.45.27991)
- Zhou R., Mohr S., Hannon G. J. et Perrimon N. (2013). Inducing RNAi in Drosophila cells by transfection with dsRNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, **8**(5): 461-463. (doi:10.1101/pdb.prot074351)
- Zwarts L., Van Eijs F. et Callaerts P. (2014). Glia in Drosophila behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, **201**(9): 879-893. (doi:10.1007/s00359-014-0952-9)



# ANNEXES



## Video Article

Testing *Drosophila* Olfaction with a Y-maze AssayMégane M. Simonnet<sup>1,2,3</sup>, Martine Berthelot-Grosjean<sup>1,2,3</sup>, Yael Grosjean<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR-6265 CNRS<sup>2</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR-1324 INRA<sup>3</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Université de BourgogneCorrespondence to: Yael Grosjean at [yael.grosjean@u-bourgogne.fr](mailto:yael.grosjean@u-bourgogne.fr)URL: <http://www.jove.com/video/51241>DOI: [doi:10.3791/51241](https://doi.org/10.3791/51241)

Keywords: environmental effects (biological, animal and plant), genetics (animal and plant), life sciences, animal biology, behavioral sciences, Y-maze, olfaction, adult, choice, behavior, *Drosophila melanogaster*.

Date Published: 4/16/2014

Citation: Simonnet, M.M., Berthelot-Grosjean, M., Grosjean, Y. Testing *Drosophila* Olfaction with a Y-maze Assay. *J. Vis. Exp.* (), e51241, doi:10.3791/51241 (2014).

## Abstract

Detecting signals from the environment is essential for animals to ensure their survival. To this aim, they use environmental cues such as vision, mechanoreception, hearing, and chemoperception through taste, via direct contact or through olfaction, which represents the response to a volatile molecule acting at longer range. Volatile chemical molecules are very important signals for most animals in the detection of danger, a source of food, or to communicate between individuals. *Drosophila melanogaster* is one of the most common biological models for scientists to explore the cellular and molecular basis of olfaction. In order to highlight olfactory abilities of this small insect, we describe a modified choice protocol based on the Y-maze test classically used with mice. Data obtained with Y-mazes give valuable information to better understand how animals deal with their perpetually changing environment. We introduce a step-by-step protocol to study the impact of odorants on fly exploratory response using this Y-maze assay.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/51241/>

## Introduction

Chemoreception through taste or olfaction is a key sensory modality for animal survival. It gives vital cues necessary for the detection of a danger or food sources, as well as for social interactions. It also helps animals to find a sex partner necessary for their reproduction. For more than 20 years, intensive research, including Nobel prize winning work by Richard Axel and Linda Buck in 2004 "for their discoveries of odorant receptors and the organization of the olfactory system", has been carried out to reveal the molecular and cellular bases of olfaction<sup>1,2</sup>.

One of the favorite animal models for scientists to dissect olfactory perception is *D. melanogaster*. This insect shares a similar cellular and molecular odor-coding strategy with mammals. The scientific community uses diverse behavioral paradigms to study the role of odorants in this fruit fly. These tests include multimodal assays such as courtship tests where various sensory modalities, including olfaction, are important to elicit male courtship<sup>3</sup>. Other assays have also been developed to tackle the role of odorants more specifically; these include T-mazes, Y-mazes, trap assays, four-field arenas and wind-tunnels<sup>4,5,6,7,8</sup>.

In this article we present a simple modified Y-maze assay, which provides robust olfactory responses using *D. melanogaster*. Our set-up uses end-tips in contrary to a previously described method<sup>9</sup>. Thus, our Y-maze has two advantages. First, it avoids any return in the system once the fly has made her choice. Second, it limits the exchange of odorants in all areas of the Y-maze. This last advantage is important since *Drosophila* are very sensitive to air flow which is often used to avoid odorant saturation. To adjust the experimental set-up with an air flow would be time and cost consuming. Therefore, our Y-maze assay represents an efficient and fast way to test olfactory performance of *Drosophila*.

## Protocol

## 1. Before Starting

1. Use an isogenized reference stock bearing stable and robust behavioral phenotypes. There is no general rule for choosing this stock, since all potential controls may carry heterogeneous background alleles.
2. Use this control strain to backcross every other stock necessary for later steps. This backcrossing step is typically represented by at least 5 successive crosses of a single virgin female (to allow possible crossing-over between homologous chromosomes) to 2–3 isogenic reference males<sup>5</sup>. This step is important to homogenize the genetic background between the different fly stocks.
3. Maintain *Drosophila* stocks on a standard corn flour (9%), yeast (10%), and agar medium (1.5%) complemented with antibiotic (0.4% methyl para-hydroxy-benzoate) in a 12-hr light/dark cycle at 25 °C.



4. Achieve chemosensory experiments in a temperature-controlled room (25 °C) under far red light (to eliminate the contribution of visual cues, and to focus on chemosensory signals). Regularly renew the air of the room to ventilate the area between each experiment.

## 2. Olfactory Response using a Y-maze Assay

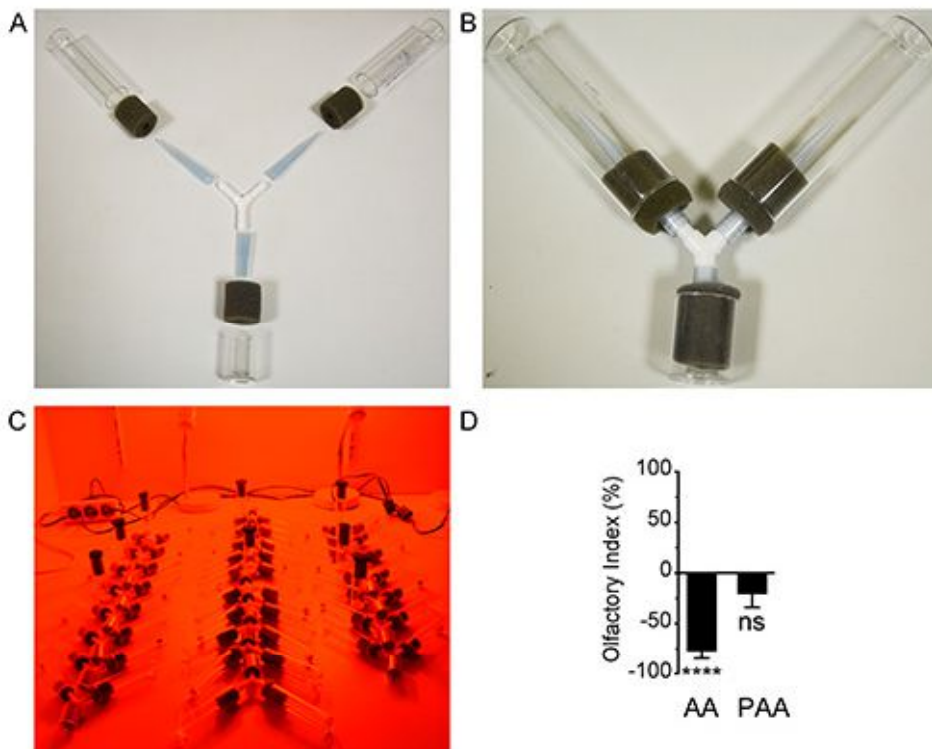
1. Starve the flies for 16–18 hr at 25 °C in glass tubes containing wet paper towel before testing.
2. Join a Y-shape connector to two glass vials and to a smaller plastic vial (loading vial). Use 1 ml pipet tips that pass through the foam stoppers to link the connector to the three vials, and to obtain a tightly sealed Y-maze. Cut the narrow ends of two pipet tips (~2 mm diameter, to avoid any return of the fly once it has made its decision) to form two “trap” vials, and a large end of one pipet tip to form the “loading” tube (**Figure 1A**).
3. Just before connecting the “trap” vials (**Figure 1B**), place one ~6 mm diameter filter paper in each vial. Add 40 µl of odorant solution on one filter paper, and 40 µl of the corresponding solvent on the second filter paper.
4. Introduce ten 4 to 9 day-old flies into the “loading” vial. Do not use CO<sub>2</sub> anesthesia during this transfer, since it has a strong effect on behavior<sup>10</sup>. Rather use brief cooling on ice. Proper manipulation of anaesthetized flies is important to limit stress on the subjects as much as possible.
  1. Perform a series of Y-maze tests at 25 °C under far-red light (using LED bulbs to limit possible heating source) to avoid visual stimuli as much as possible. Be careful to alternate the orientations of the Y-mazes (odorant containing tube on the left, or on the right, and loading tube in front or in the back; **Figure 1C**).
  2. Allow several hours for the flies to enter in the trap vial containing the odorant or the solvent. Count flies after 24 hr to increase the participation up to more than 80% and provide the maximum olfactory index value (Simonnet, personal communication).
  3. Calculate the resulting olfactory index using the following formula: (number in the odor tube - number in the solvent tube)/total number of loaded flies.
5. Wash Y-maze set-up as follows: soak the dismantled set-up in RBS 35 MD overnight. Thoroughly rinse out with tap water. Finally rinse with deionized water and let dry out.

## 3. Statistical Analysis of the Data

1. Perform a t-test, a one-way ANOVA or a two-way ANOVA depending on data and variables.

### Representative Results

**Figure 1D** shows two representative responses using this Y-maze assay. Canton-S males strongly avoid 10% acetic acid diluted in distilled water, whereas they do not significantly avoid 10% phenylacetic acid. These assays are based on 10 males per replicate placed together in the loading vials. This protocol can sometimes lead to large standard error of the mean. If needed, it is possible to reduce this drawback by using 20 males per replicates instead of only 10. Mathematically, the choice of one individual has a lower weight on the index value for a larger sample size.



**Figure 1. Male olfactory response assessed with a Y-maze set-up.** **A)** Split device. **B)** Assembled device. **C)** Set-up in working condition under far-red light. **D)** Quantification of male olfactory responses toward acetic acid (AA) or phenylacetic acid (PAA) both diluted in distilled water (10% v/v) (N = 11, representing a total of 110 flies). Statistical analysis was performed using a t-test comparing the data to 0. 0 means no preference. A negative value indicates an aversion to the odorant, and a positive value an attraction. \*\*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; ns: non-significant ( $p = 0.1680$ ).

## Discussion

Our Y-maze protocol is based on a previously described protocol<sup>9</sup>. However, we introduce two major differences. First, we use narrow pipet tips to prevent the flies from returning once they decide to enter in the vial containing the solvent or the solvent plus the odorant. These narrow tips are also useful to limit the odorant diffusion in the Y-maze. Second, we use a smaller loading vial to force the flies to enter in the Y-maze. It is important to have a high participation of these flies (80% to 100% after 24 hr; Simonnet, personal communication).

This Y-maze assay represents an efficient test to evaluate chemosensory responses in *Drosophila*. The context of the test, including stress on the flies (from air flow, manipulation of the flies during the loading step, etc.) is potentially influencing their olfactory responses. These environmental issues are critical and could explain, at least partially, why different studies could have different behavioral outcomes. For example acetic acid is shown to be repulsive in some conditions<sup>4,11</sup>, whereas it is attractive in others<sup>12</sup>. Therefore it is critical to control all of these parameters as much as possible.

One possible limitation of this Y-maze assay is its artificial context for flies since they are held in a locked design. Additionally, flies have to enter in narrow passages, which might be stressful for them. The experimenter has to remember this when interpreting the data.

To bypass these possible limitations, other complementary olfactory tests could be performed to confirm the impact of odorants on behavior. These tests include T-mazes<sup>4</sup>, 4 field-arena assays<sup>7</sup>, or wind tunnels<sup>8</sup>. However, these tests also utilize artificial environments for flies, which could be more or less stressful. For example, during T-maze tests flies are highly stressed since they are shaken during the loading step<sup>4</sup>. However, an advantage of a T-maze compared to this Y-maze assay is that flies have to choose within minutes where to go (to the odorant or to the solvent). Therefore the Y-maze response represents a "reflective" choice, whereas outcomes obtained with a T-maze represent a reflex choice in a highly stressful condition.

Finally a possible improvement of this Y-maze assay would be to use glass tubes all along the set up instead of plastic for some components (loading tube, connector, pipet tips). These plastic parts can, in theory, have a smell since they are made from petrol.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

## Acknowledgements

We thank 4 anonymous reviewers for their work to improve the manuscript. We thank the Centre National de la Recherche Scientifique for its financial support to MBG and YG, and the Université de Bourgogne and the French Ministry of Research to MMS. Research in YG laboratory is funded by the European Research Council (ERC Starting Grant, GII-SFCo-311403), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC, GGCB-2010), the Conseil Régional de Bourgogne (Faber), and the CNRS.

## References

1. Mombaerts, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 263-278 (2004).
2. Silbering, A.F., Benton, R. Ionotropic and metabotropic mechanisms in chemoreception: 'chance or design'? *EMBO Rep.* **11**, 173-179 (2010).
3. Ziegler, A.B., Berthelot-Grosjean, M., Grosjean, Y. The smell of love in *Drosophila*. *Front. Physiol.* **4**, 72 (2013).
4. Silbering, A.F., et al. Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems. *J. Neurosci.* **31**, 13357-13375 (2011).
5. Grosjean, Y., et al. An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila*. *Nature*. **478**, 236-240 (2011).
6. Woodard, C., Huang, T., Sun, H., Helfand, S.L., Carlson, J. Genetic analysis of olfactory behavior in *Drosophila*: a new screen yields the *ota* mutants. *Genetics*. **123**, 315-326 (1989).
7. Semmelhack, J.L., Wang J.W. Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature*. **459**, 218-223 (2009).
8. Budick S.A., Dickinson M.H. Free-flight responses of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. *The Journal of Experimental Biology*. **209**, 3001-3017 (2006).
9. Martin, F., Charro, M.J., Alcorta, E. Mutations affecting the cAMP transduction pathway modify olfaction in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. A*. **187**, 359-370 (2001).
10. Barron A.B. Anaesthetizing *Drosophila* for behavioural studies. *Journal of Insect Physiology*. **46**, 439-442 (2000).
11. Ai, M., et al. Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system. *Nature*. **468**, 691-695 (2010).
12. Becher, P.G., Bengtsson, M., Hansson, B.S., Witzgall, P. Flying the fly: long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. *J. Chem. Ecol.* **36**, 599-607 (2010).

Materials List for:

## Testing *Drosophila* Olfaction with a Y-maze Assay

Mégane M. Simonnet<sup>1,2,3</sup>, Martine Berthelot-Grosjean<sup>1,2,3</sup>, Yael Grosjean<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR-6265 CNRS

<sup>2</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR-1324 INRA

<sup>3</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Université de Bourgogne

Correspondence to: Yael Grosjean at [yael.grosjean@u-bourgogne.fr](mailto:yael.grosjean@u-bourgogne.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/51241>

DOI: [doi:10.3791/51241](https://doi.org/10.3791/51241)

### Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
Drosophila Polystyrene tube	VWR europe	734-2255	30 x 25 mm Y-maze
Drosophila Borosilicate tube	Dijon verre		95 X 25 mm Y-maze
Foam stopper	Dutscher	999038	Y-maze
Y-shaped connector	Europrix	11020605	Y-maze
100-1,000 µl pipet tips	Corning	4868	Join the following pipet tips to the Y-shaped connector. Cut 2 pipet tips at 65 mm from the wide end, and connect the narrow end (with a #2 mm opening) to 2 test vials. These openings will limit the U-turns once the flies enter the tubes containing the odors. Cut 1 pipet tip at 35 mm from the wide end, and connect it to the loading vial. Y-maze
Far-Red LED Bulb	Rubin-Lacaque	0RB180238	625-630 nm
Acetic Acid	Sigma-Aldrich	45725	
Phenylacetic Acid	Sigma-Aldrich	P16621	
Yeast	Sensient Flavors Strasbourg	1018880464	
Cornmeal	eurogerm	Farine de maïs	
Agar	Kalys	HP-697-25	
Methyl hydroxy 4 benzoate	VWR international	25605293	



Title: The Amino Acid Transporter JhI-21 Coevolves with Glutamate Receptors, Impacts NMJ Physiology, and Influences Locomotor Activity in *Drosophila* Larvae.

**Anna B. Ziegler<sup>1,2,3</sup>, Hrvoje Augustin<sup>4</sup>, Nathan L. Clark<sup>5</sup>, Martine Berthelot-Grosjean<sup>1,2,3</sup>, Mégane M. Simonnet<sup>1,2,3</sup>, Joern R. Steinert<sup>6</sup>, Flore Geillon<sup>1,2,3</sup>, Gérard Manière<sup>1,2,3</sup>, David E. Featherstone<sup>4</sup> and Yael Grosjean<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France.

<sup>2</sup>INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France.

<sup>3</sup>Université de Bourgogne-Franche-Comté, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France.

<sup>4</sup>Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, Illinois 60607, Chicago, USA

<sup>5</sup>Department of Computational and Systems Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh 15260, Pennsylvania, USA

<sup>6</sup>MRC Toxicology Unit, University of Leicester, LE1 9HN Leicester, UK

H.A.'s present address: Institute of Healthy Ageing, and GEE, University College London, WC1E 6BT London, UK

\* Corresponding author:

e-mail address: [yael.grosjean@u-bourgogne.fr](mailto:yael.grosjean@u-bourgogne.fr)

## **Abstract**

Changes in synaptic physiology underlie neuronal network plasticity and behavioral phenomena, which are adjusted during development. The *Drosophila* larval glutamatergic neuromuscular junction (NMJ) represents a powerful synaptic model to investigate factors impacting these processes. Amino acids such as glutamate have been shown to regulate *Drosophila* NMJ physiology by modulating the clustering of postsynaptic glutamate receptors and thereby regulating the strength of signal transmission from the motor neuron to the muscle cell. To identify amino acid transporters impacting glutamatergic signal transmission, we used Evolutionary Rate Covariation (ERC), a recently developed bioinformatic tool. Our screen identified ten proteins co-evolving with NMJ glutamate receptors. We selected one candidate transporter, the SLC7 (Solute Carrier) transporter family member JhI-21 (Juvenile hormone Inducible-21), which is expressed in *Drosophila* larval motor neurons. We show that

JhI-21 suppresses postsynaptic muscle glutamate receptor abundance, and that JhI-21 expression in motor neurons regulates larval crawling behavior in a developmental stage-specific manner.

## **Introduction**

The glutamatergic *Drosophila melanogaster* larval neuromuscular junction (NMJ) is a powerful well-established model for the study of synaptic development and function. During the three larval stages the morphology of the NMJ changes dramatically<sup>1,2</sup>. From the hatching of a *Drosophila* larva up to the last larval instar, the muscle surface increases faster than the growth of the nerve terminals that innervate it. Despite this, the strength of these synapses is maintained at the same level<sup>3</sup>. This means that during larval development either the amount of released neurotransmitter or the receptivity of the muscle cell have to be adjusted. This could be achieved via a variety of mechanisms, including addition of new synapses to each junction, and changes in strength of individual synapses.

NMJ strength can also be tuned in previously unsuspected ways. In a previous study, for example, we identified a glial amino acid exchanger, Genderblind (GB), which is capable of tuning synaptic strength by regulating the amount of extracellular glutamate. This glutamate constitutively desensitizes ionotropic glutamate receptors (iGluRs), inhibits their clustering, and thereby suppresses synaptic transmission<sup>4,5</sup>. We also showed that the presynaptic neuron is capable of secreting non-vesicular glutamate through an unknown transporter to regulate NMJ strength by modulating iGluR clustering<sup>6</sup>.

In order to identify amino acid transporters that might regulate synaptic physiology during development, we used Evolutionary Rate Covariation (ERC). ERC is a recently established bioinformatic method that identifies functional relationships between proteins based on their evolutionary histories. The hypothesis of ERC is that functionally related

proteins experience similar evolutionary selective pressures and hence have rates of evolution that correlate across species. ERC values are calculated by generating phylogenetic trees using full protein sequences and computing the correlation between the rates of change of two proteins across the branches of a phylogeny. The resulting values could range from 1 in case of positive correlation to -1 in case of negative correlation (Figure 1a) <sup>7</sup>. ERC has previously been used to study proteins that are physically interacting or present in the same protein complex <sup>8-12</sup>. However, recent studies demonstrated that functionally related and coexpressed genes reveal positive and significant ERC values as well <sup>7</sup>. In this study, we screened for transporters showing evolutionary covariation with six glutamate receptor subunits. We hypothesized that the co-evolution of amino acid transporters and glutamate receptors might lead to the identification of unknown genes involved in glutamatergic signaling. We subsequently tested the functional relationship between those six GluRs and the transporters by taking advantage of the very well studied *Drosophila* larval NMJ physiology. Six GluRs have been shown to impact synaptic strength at this synapse: a metabotropic glutamate receptor subunit (mGluRA) expressed in motor neurons, and five iGluR subunits (GluRIIA, GluRIIB, GluRIIC, GluRIID, and GluRIIE) forming the ionotropic A- and B-type receptors expressed by the post-synaptic muscle cell <sup>13,14</sup>. We were particularly interested in transporters co-expressed with either mGluRA in motor-neurons or with iGluR subunits in muscle cells.

Using these criteria, we found a strong ERC value between these glutamate receptor subunits and the amino acid transporter JhI-21. Consistent with the idea that ERC predicts functional relationships, we found that JhI-21 negatively regulates iGluR clustering at NMJs and plays a role in locomotion control during late larval development. Investigating the reason for these effects, we discovered differential expression of JhI-21 in the central nervous system neurons and at the NMJ during larval feeding and wandering stages. Taken together, our results demonstrate how ERC can be used to find novel previously unsuspected roles for



proteins, and reveal for the first time a role for JhI-21 in glutamatergic synapse function and behavior.

## Results

*JhI-21 is identified as a component of the glutamatergic signaling pathway by Evolutionary Rate Covariation (ERC).*

Six glutamate receptor subunits (mGluRA, GluRIIA-E) are known to be key members for signal transmission at the glutamatergic 3<sup>rd</sup>-instar larval NMJ. We identified their orthologs in 12 *Drosophila* species and calculated their ERC values (Figure 1b). The six glutamate receptors showed overall positive scores indicating robust rate covariation. The mean ERC value between all possible pairs of those 6 proteins is 0.556 and is strongly significant ( $p = 0.00021$ , permutation test; Table 1). Positive ERC values are typically found for proteins acting as subunits in the same complex, as in the case for the ionotropic glutamate receptor subunits GluRIIA-E. Glutamate receptors in larval NMJs localize to postsynaptic densities on the surface of the muscle cell and always contain GluRIIC, GluRIID, and GluRIIE subunits. In addition, “A-Type” receptors contain GluRIIA while “B-Type” receptors contain GluRIIB. In contrast, the metabotropic mGluRA receptor subunit is expressed in the innervating motor neuron, and acts in a glutamatergic feedback loop regulating the amount of transmitter released<sup>15</sup>. Even though metabotropic and ionotropic glutamate receptors are not co-localized within the same cell at the NMJ of 3<sup>rd</sup>-instar larvae, they do act in the same intercellular signaling pathway and therefore the ERC values between the two different types of receptors are very high. These conditions demonstrate that ERC can detect proteins that function together despite being expressed in different cells. This finding enabled us to use this technique to screen for previously unrecognized candidate amino acid transporters associated with glutamatergic signal transmission.

In total, we first screened 39 confirmed and putative amino acid transporter homologs<sup>16,17</sup> for rate covariation with the six glutamate receptors mentioned above (Table 2 and Supplemental Table1). Ten putative transporters showed positive and significant ( $p < 0.05$ ) ERC values with the six glutamate receptor subunits (Table 2, Figure 2). To prove the functional relationship between these GluRs and our positive hits we decided to focus next on the glutamatergic larval NMJ. The cell bodies of motor-neurons expressing mGluRA are located in the ventral nerve cord of the larval CNS. Those neurons project their axons towards the body wall where they contact muscle cells, which express iGluRs. Therefore, in parallel we used a second screening procedure to determine which transporters are most highly expressed in either the CNS (where motor neuron cell bodies are housed) or the body wall (location of NMJs) (Tables 1 and 2). We found eleven putative transporter genes (Table 2, Figure 2). We selected one significant hit from our ERC analysis, JhI-21, which also matched very well our second criterion concerning the expression pattern in the neuromuscular system (Figure 2).

The single ERC values of JhI-21 compared to the different glutamatergic receptors range from 0.298 to 0.59 (Supplemental Table 1). The global ERC value for JhI-21 and the six glutamate receptor subunits that we examined is 0.3788 ( $p = 0.0019$ , permutation test) (Table 2). This very high co-evolutionary statistic suggested that JhI-21 and the glutamate receptor subunits co-evolved and therefore may be functionally related.

JhI-21 was initially discovered in a screen for juvenile hormone (JH) inducible genes<sup>18,19</sup>. It was classified as a SLC7A5-11 family member based on sequence analysis<sup>4</sup>, and amino acid uptake into cultured cells<sup>20</sup>. The *Drosophila* genome encodes four more putative SLC7A5-11 paralogs: Genderblind (GB), Minidiscs (Mnd), CG9413 and CG1607<sup>4,20</sup>. GB controls extracellular glutamate levels, which in turn regulates the number of iGluRs in the glutamatergic NMJ<sup>4,21</sup>. This unexpected function -regulation of iGluRs in synapses- was recently shown to be also conserved in mice<sup>22</sup>.

We therefore turned our attention to testing explicitly whether JhI-21 and iGluRs in the *Drosophila* are functionally related, as predicted by ERC.

*JhI-21 is expressed in motor neurons at the glutamatergic NMJ of 3<sup>rd</sup> instar larvae.*

We first investigated whether JhI-21 is expressed at the larval neuromuscular junction close to the glutamate receptor subunits with which ERC revealed it to coevolve. The *Drosophila* larval NMJ is a tripartite synapse containing the presynaptic motor neuron, the postsynaptic muscle cell, and adjacent glia. All three cell-types are known to be involved in regulating synaptic development and physiology<sup>23</sup>. First, we designed a polyclonal anti-JhI-21 antibody and confirmed its specificity in JhI-21 null mutant embryos (Figure S1). As shown in Figure 3a, we could detect the anti-JhI-21 labeling at the NMJ. This anti-JhI-21 signal co-localized with the anti-HRP, which marks presynaptic motor terminals. These data therefore strongly suggest that JhI-21 is expressed in motor neuron terminals.

However, the close proximity of different cell types (neurons, muscle, or glia) at the NMJ makes it difficult to conclude cell-type expression based on light microscopy alone. To address this problem, we generated transgenic flies in which Gal4 is expressed under the control of a putative *JhI-21* regulatory region, and then examined the expression pattern of UAS-nSyb::GFP using the Gal4/UAS system<sup>24</sup> (Figure 3b). Synaptobrevin (Syb) is a synaptic terminal protein, and therefore nSyb::GFP will be enriched at synaptic endings when expressed in neurons<sup>25</sup>. Consistent with the conclusion that JhI-21 is expressed in motor neurons, nSyb::GFP expressed under control of *JhI-21*-Gal4 was localized to synaptic terminals. To ensure that nSyb::GFP did not localize similarly when expressed in glia or muscles, we also expressed nSyb::GFP under the control of well-characterized glial and muscle cell Gal4 drivers (repo-Gal4 and 24B-Gal4, respectively; Figure 3c & d). As expected, the nSyb::GFP fluorescence pattern in these cases was drastically different from when nSyb::GFP is expressed in motor neurons. We therefore conclude that JhI-21 is

normally expressed in motor neurons and (based on antibody staining) at least in part localized to motor neuron terminals.

To determine whether JhI-21 was expressed in other parts of the motor neurons, we examined the expression of JhI-21 protein in the ventral nerve cord (VNC), and compared it to the location of glutamatergic motor neurons cell bodies marked using the OK6-Gal4, which is expressed in motor neurons, or OK371-Gal4, which is expressed in glutamatergic neurons, using membrane-bound GFP (mCD8::GFP) as a reporter transgene. As shown in Figure 3e, anti-JhI-21 labeling was detected in cell bodies at the VNC. While most neurons appear to express low levels of JhI-21, some neurons identified as a subset of glutamatergic motor neurons by the OK6-Gal4 or OK371-Gal4 driven expression of mCD8::GFP, express JhI-21 at a higher level (solid arrow in Figure 3e; white bordered arrow in Figure 3f). According to the results obtained with our anti-JhI-21 antibody and our *JhI-21*-Gal4 transgene, JhI-21 seems to be expressed in neurons of 3<sup>rd</sup>-instar larvae, with highest expression in motor neurons (Figure 3, Figure S2). However, our *JhI-21*-Gal4 transgene recapitulates just partially the endogenous expression of JhI-21 expression in the brain (Figure S2), suggesting that JhI-21 expression in motor neurons may be variable or actively regulated.

#### *Loss of JhI-21 expression increases iGluR clustering in NMJs.*

The expression pattern of JhI-21, along with its co-evolution with glutamate receptors, raised the possibility that JhI-21 regulates NMJ physiology. To test this hypothesis, we performed two-electrode voltage-clamp electrophysiology to measure spontaneous excitatory junction currents (sEJCs) in control and *JhI-21* mutant larval NMJs (muscle 6, segment A3). We used the hypomorphic *JhI-21* allele P{SUPor-P}*JhI-21*[KG00977], (hereafter referred to as '*JhI-21 KG*'), which was generated by the BDGP Gene Disruption Project and carries a P{SUPor-P} transposable element in the first exon of the *JhI-21* gene<sup>26</sup>. The *JhI-21 KG* allele was used homozygous or in combination with a deficiency (*Df1* is *Df(2L)esc-P3-0*), in which

the *JhI-21* gene is deleted<sup>27</sup>. Another strain, *PJhI-21*[EP1187] (*JhI-21 EP*), contains UAS-binding sites and was used to over-express JhI-21<sup>28</sup>. As controls, we used *w<sup>1118</sup>* (control 1) and *P\*82* (control 2). *P\*82* is a clean excision allele of the *JhI-21* P-element [*KG00977*] (Figure 4a)<sup>29</sup>. As shown in Figure 4d, sEJC amplitudes are strongly correlated with *JhI-21* expression as measured by q-PCR. sEJC amplitude distributions measured in the two control strains are nearly indistinguishable from each other ( $P > 0.05$ , n.s., Kolmogorov-Smirnov test). The *JhI-21* hypomorphs, however, display significantly larger spontaneous postsynaptic currents ( $P < 0.05$ ). In contrast, larvae overexpressing *JhI-21* show smaller postsynaptic currents ( $P < 0.01$  compared to control 1; Figure 4b and c; Figure S3).

sEJC frequencies were not significantly different between genotypes (control 1 =  $2.6 \pm 0.5$  Hz; control 2 =  $2.3 \pm 0.3$  Hz; *JhI-21 KG* =  $1.9 \pm 0.2$  Hz; *JhI-21 KG/Df1* =  $2.5 \pm 0.3$  Hz; *tub-Gal4/JhI-21 EP* =  $1.7 \pm 0.3$  Hz; n.s.) ruling out the possibility of changes in presynaptic release.

As expected based on changes in sEJC size, overexpression of JhI-21 in the *JhI-21 EP* strain led to a reduction in evoked excitatory junction currents (eEJCs; Figure S4). This suggests that increased JhI-21 leads to less muscle excitation. However, we observed no significant differences between the controls and loss-of-function mutant genotypes (Figure S4).

The number of NMJ branches, number, and bouton area were not statistically different in between controls and *JhI-21* mutant alleles (Figure 4e).

The dramatic changes in sEJC amplitude without apparent changes in NMJ morphology or frequency of neurotransmitter release suggest that *JhI-21* mutant NMJs might cause alterations in the number of postsynaptic glutamate receptors. To test this, we measured postsynaptic glutamate receptor protein abundance immunohistochemically.

*Drosophila* muscle cells express two different subtypes of heterotetrameric iGluRs, called ‘A-type’ and ‘B-type’, which can be distinguished immunocytochemically using antibodies against the subunits unique to each receptor type: GluRIIA, and GluRIIB<sup>30-33</sup>. Using anti-GluRIIA and anti-GluRIIB antibodies, we compared the immunoreactivity for both A- and B-type receptors in wild-type controls and in the *JhI-21* alleles. The strongest *JhI-21* hypomorph allele (*JhI-21 KG/Df1*) causes a ~5-fold increase in the postsynaptic receptor abundance for A-type receptors and a ~3.5-fold increase in B-type receptors compared to control. In contrast, overexpression of JhI-21 (*tub-Gal4/JhI-21 EP*) caused a significant decrease in A- and B-type receptors compared to control genotypes at the NMJ (Figure 5). We obtained the same effect when looking at the GluRIIC subunit, which is shared by A- and B-type receptors (Figure 6). Overall, as observed for sEJC amplitudes, the iGluR immunoreactivity was negatively correlated to the amount of larval *JhI-21* mRNA detected by q-PCR (Figure 5). Taken together, these results show that JhI-21 negatively regulates glutamatergic transmission and the abundance of iGluR protein at the larval NMJ.

We next wondered if the action of JhI-21 on iGluR clustering could be through the action of glutamate, based on previous work showing that the related transporter GB controls iGluR abundance via regulation of extracellular glutamate<sup>4,5</sup>. Consistent with this idea, we could fully rescue the phenotype of our strongest mutant by bathing *JhI-21 KG/Df1* NMJs with 2mM glutamate during 24h when measuring GluRIIC staining (Figure 6). Unfortunately our intense efforts to test if JhI-21 could transport (or not) glutamate, by glutamate quantification in the hemolymph or by using the S2 cell model system, failed to give conclusive results (Figure S7).

#### *JhI-21 regulates locomotor behavior.*

Our results reveal JhI-21 as an unexpected regulator of NMJ iGluR abundance and spontaneous synaptic transmission strength. But what role does this novel form of regulation

play? To test whether changes in *JhI-21* expression at the NMJ and/or in the CNS could have behavioral consequences we measured speed and meandering (turning rate) at two different physiological stages of 3<sup>rd</sup>-instar larvae: feeding and wandering (shortly before pupation).

In the absence of food, wildtype feeding-stage larvae moved significantly faster than wildtype wandering-stage larvae ( $0.093 \pm 0.003$  cm/sec, and  $0.070 \pm 0.003$  cm/sec respectively;  $p < 0.0001$ ). Also, feeding-stage larvae had a lower turning rate compared to the wandering-stage larvae ( $1651 \pm 151$  deg/cm for feeding-stage larvae compared to  $2918 \pm 335$  deg/cm for wandering ones;  $p < 0.01$ ; Figure 7a and b).

To test whether *JhI-21* regulates locomotor behavior, we used the hypomorphic *JhI-21 KG* allele. Wandering homozygous *JhI-21 KG* hypomorphs still showed a significant decrease in speed (from  $0.078 \pm 0.003$  cm/sec in feeding stage to  $0.066 \pm 0.003$  cm/sec in wandering stage;  $p < 0.05$ ), but no change in meandering ( $2263 \pm 210$  deg/cm in feeding stage versus  $2677 \pm 269$  deg/cm in wandering stage; n.s.). In the strongest viable mutants, *JhI-21 KG/Dfl* hypomorphs, neither speed ( $0.083 \pm 0.003$  cm/sec in feeding stage and  $0.081 \pm 0.003$  cm/sec in wandering stage) nor meandering ( $2685 \pm 331$  deg/cm in feeding stage and  $2126 \pm 195$  deg/cm in wandering stage) differed between feeding and wandering larvae (Figure 7a and b; Figure S5). Therefore, *JhI-21* mutants do not exhibit normal differences between feeding and wandering larvae in locomotor characteristics (speed and meandering) that are displayed by control animals.

To confirm the association between *JhI-21* expression level and locomotor behavior, we divided within each genotype the mean value scored for feeding animals by the mean value scored for wandering animals, and plotted this ratio against the average *JhI-21* mRNA levels. The ratio for speed negatively correlates with *JhI-21* mRNA levels, while the ratio for meandering positively correlates with the expression levels of *JhI-21* mRNA (Figure 7a and b).

We also looked at other locomotor phenotypes such as the number of stops and go, and the peristaltic waves along the length of the larval body axis. No difference between feeding and wandering larvae were found (Figure S6). Since all genotypes tested in this assay showed also no difference in developmental time or lethality (Figure 7c), *JhI-21* expression at the NMJ and/or in the CNS seems to specifically regulate locomotor behavior shifts (speed and meandering) that normally occur in late 3<sup>rd</sup>-instar larvae.

*Synapse physiology differs in feeding and wandering 3<sup>rd</sup>-instar larvae*

If JhI-21 regulates NMJ physiology, and this regulation affects feeding and wandering behavior, then there should be differences in NMJ physiology between feeding and wandering larvae. To test this, we compared sEJC amplitude distributions in feeding and wandering animals. In our control genotype we observed overall smaller amplitudes of sEJCs when larvae were in the wandering stage compared to feeding stage larvae ( $p < 0.0001$ ). This change could be explained by JhI-21-mediated inhibition of iGluR clustering at the postsynaptic muscle cell during the wandering stage (Figure 4). To test this hypothesis explicitly, we compared sEJCs in our strongest JhI-21 hypomorph (*JhI-21 KG/Dfl*). The JhI-21 hypomorphs exhibit overall larger spontaneous miniature postsynaptic currents in wandering stage compared to feeding 3<sup>rd</sup>-instar larvae, consistent with the hypothesis ( $p < 0.001$ ; Figure 8).

*JhI-21 is differentially expressed in feeding and wandering 3<sup>rd</sup>-instar larvae.*

How does JhI-21 regulate feeding and wandering behavior? One possibility is that JhI-21 expression at the NMJ, and thus the strength of NMJ regulation, differs between feeding and wandering stages. To test this we stained the nervous system of feeding and wandering 3<sup>rd</sup> instar larvae with the anti-JhI-21 antibody and analyzed the expression levels. In the VNC, where the cell bodies of motor neurons are located, expression of JhI-21 is significantly



higher in feeding animals than in wandering ones (feeding stage  $1.275 \pm 0.266$ , wandering stage  $0.531 \pm 0.117$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 9a-c). The anti-Bruchpilot antibody nc82 labels the neuropil<sup>34</sup> and was used as an internal control for this experiment. As shown in Figure 9d, the signal obtained with nc82 was constant between feeding-stage ( $94 \pm 6$ ) and wandering-stage larvae ( $107 \pm 10$ ). In contrast JhI-21 staining could never be detected at the NMJ of feeding-stage animals, but wandering stage animals showed strong anti-JhI-21 labeling in the NMJ (Figure 9e-f). Thus, JhI-21 subcellular localization appears to shift between feeding and wandering stages. During feeding stage, JhI-21 is predominantly in the cell bodies within the VNC and not in the motor terminals. During wandering stage, JhI-21 is strongly localized in the motor terminals at the NMJ, and less abundant in the cell bodies within the VNC.

## Discussion

### *Evolutionary rate co-variation identified JhI-21 as a member of glutamatergic signaling*

In this study we used the “covariation of protein evolutionary rates” to screen for proteins that might play unsuspected roles in glutamatergic synapse physiology. It has been previously demonstrated that ERC signatures provide a powerful method to reveal functionally related proteins or proteins acting in the same complex<sup>8,35,36</sup>. As expected, physically interacting ionotropic glutamate receptor (iGluR) subunits GluRIIA, GluRIIB, GluRIIC, GluRIID, and GluRIIE showed overall positive ERC values. Even if the metabotropic glutamate receptor mGluRA is neither physically interacting nor co-expressed in the same cell than iGluR subunits, it also showed positive ERC values when compared to iGluR subunits, likely due to its action in the same neurophysiological pathway. We therefore considered whether the function of two proteins in the same synapse can be sufficient to gain positive ERC values even though both the proteins are not expressed in the same cell.

We next used ERC to determine whether any of 39 putative amino acid or biogenic amine transporters genes were co-evolving with GluRs, and got 10 significant hits. Based on ERC scores and tissue expression, we selected the amino acid antiporter JhI-21 for further analysis. Specifically, we sought to determine whether JhI-21 did indeed function in the glutamatergic signaling pathway as suggested by ERC.

Using two independent strategies we showed that JhI-21 is localized in glutamatergic motor neurons in 3<sup>rd</sup>-instar larvae. JhI-21 showed the strongest correlation in terms of co-evolution with mGluRA, which is also expressed in motor neurons <sup>15</sup>. Although co-expressed proteins tend to have higher ERC values in general <sup>7</sup>, we want to highlight that JhI-21 also showed positive ERC score with the post-synaptically expressed iGluRs, indicating a previously unsuspected but important role for JhI-21 in adjusting the strength of glutamatergic neuromuscular transmission.

Interestingly, other significant hits are not even expressed in the CNS or the body wall. For example CG8785 is expressed only in the digestive system and malpighian tubules. Both tissues also contain iGluRs. What might be the role of iGluRs in the digestive and *Drosophila* renal system and what could be the link to the co-evolution with CG8785 is an interesting subject for further studies.

#### *Possible direct action of JhI-21 in adjusting synaptic strength at the larval NMJ*

The fact that JhI-21 is expressed at the glutamatergic synapse allowed us to further elucidate the functioning of the NMJ in *Drosophila*. Specifically, we found that JhI-21 expression in motor neurons leads to inhibition of synaptic transmission by reducing the clustering abundance of iGluRs in neuromuscular junctions of late stage 3<sup>rd</sup>-instar larvae. This could be linked to the extracellular glutamate concentration since additional application of glutamate can compensate a lack of JhI-21 activity in *JhI-21* hypomorph mutants when

measuring the amount of iGluR expression at the NMJ (Figure 6). It is therefore reasonable to ask whether JhI-21 has a direct impact on extracellular glutamate levels at the NMJ.

Indeed JhI-21 was classified as a SLC7A5-11 family member based on sequence analysis<sup>4</sup>. These transporters can be found in many species across the animal kingdom and other members of this transporter family have been proven to regulate glutamatergic signaling directly by adjusting extracellular glutamate levels in mammals and *Drosophila*<sup>4,20</sup>. This extracellular glutamate is mostly independent of synaptic vesicular release<sup>6,37,38</sup>, and is partly attributable to glial expressed SLC7A11 transporters<sup>4,21,39</sup>. Those transporters in mammals act as heterodimers consisting of a 'light chain' SLC7A5-11 core catalytic subunit in combination with a 'heavy chain' subunit (such as 4F2hc protein) that is required for trafficking to the plasma membrane<sup>40-43</sup>. GB, which is the homologue of JhI-21, previously revealed to be expressed in a particular subset of glia at the larval NMJ, was the first *Drosophila* SLC7A5-11 member shown to directly impact the physiology of this glutamatergic synapse by exporting glutamate into the hemolymph<sup>4,44</sup>. This led us speculate that JhI-21 might also export glutamate directly. Nevertheless, when compared to GB, JhI-21 does not affect the overall hemolymph glutamate concentration<sup>29</sup>. Presumably, JhI-21 modulates postsynaptic iGluR levels via some other mechanism, or regulates glutamate only very locally near the synapse, in contrast to GB, which controls glutamate levels more globally (Figure 10). Using JhI-21 expressing S2 cell we could not demonstrate that this transporter might directly or not transport glutamate (Figure S7), although we found that incubating larval NMJs in glutamate was able to rescue the JhI-21 phenotype (Figure 6).

We also considered whether JhI-21 might be involved in loading glutamate into neurotransmitter vesicles and might thereby have a direct impact in glutamatergic transmission. No SLC7A5-11 family member is known to be a component of synaptic vesicle membrane. Also it has been shown that at the larval NMJ the vesicular glutamate transporter (VGluT, belonging to the SCL17 family) is necessary and sufficient to fill vesicles with

glutamate. Absence of VGlut leads to empty vesicles at the NMJ<sup>45</sup>. This indicates that there is no other transporter involved in the filing of glutamate into these neurotransmitter vesicles.

#### *Possible indirect action of JhI-21 in adjusting synaptic strength at the larval NMJ*

It has been previously shown that non-vesicular glutamate release is partially dependent on the amount of glutamate present in the motor neuron<sup>6</sup>. This intracellular glutamate pool is regulated via glutamate metabolizing enzymes. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) produces glutamate from aspartate. Glutamate decarboxylase (GAD) catalyzes the decarboxylation of glutamate to  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), and glutamate synthase (GS) converts glutamate to glutamine<sup>4,44</sup>. In addition glutamate dehydrogenase (GDH) catalyzes the reversible formation of glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate<sup>46</sup>. It has been shown that misexpression of glutamate metabolizing enzymes alters postsynaptic iGluR clustering by regulating presynaptic intracellular glutamate concentrations<sup>6</sup>. Instead of directly transporting glutamate, JhI-21 could therefore function to transport metabolites, activators, or suppressors associated with regulation of glutamate levels.

For example, it has been shown that JhI-21 in S2 cells transports leucine, which acts as an allosteric activator of the glutamate dehydrogenase (Gdh) and could thereby modify intracellular glutamate levels (Figure 10)<sup>20,47</sup>.

#### *Specific role of JhI-21 during late larval development*

JhI-21 expression was also previously shown to be dependent on Juvenile Hormone (JH)<sup>18,19</sup>. The role of this hormone in many insects is to maintain juvenile morphological characteristics<sup>48</sup>. In *Drosophila*, several studies suggested a role for JH in adult behaviors like foraging and sexual maturation<sup>19,49</sup>. The role of JH in larvae, however, remains unclear. In *Drosophila* larvae, the titer of JH III, the active form of JH in Diptera, is high during the first and second larval stages. In feeding stage 3<sup>rd</sup>-instar larvae, JH III levels decrease drastically

before increasing again during wandering prior to pupation<sup>50,51</sup>. These differences in JH III levels might be responsible for the differences of JhI-21 expression and subcellular localization that we observed in this study. This shift in JH III-dependent expression of JhI-21, and the resulting shift in postsynaptic sensitivity occurs at the same time as the behavioral switch in late 3<sup>rd</sup>-instar larvae. When placed on agar plate, which is low in nutrients, feeding larvae moved at a higher speed compared to wandering individuals. This hypermobility in feeding larvae could reflect aggressive searching for food. Wandering larvae, on the other hand, move at a lower pace but turn twice as much compared to feeding larvae (Figure 7). This behavior could reflect a search for the best place to start pupation. Both behaviors are altered in *JhI-21* hypermorphs, where feeding and wandering animals move at nearly the same speed and display similar turning rates. Although we could demonstrate that JhI-21 is involved in the age dependent shift of synaptic strength between feeding and wandering larvae, we can not rule out that other JhI-21 expressing cells in the brain are presumably involved in those behavioral changes. In any case, it is nonetheless clear that JhI-21 is important for regulating the change of behavior during late 3<sup>rd</sup>-instar life.

In summary, we show that ERC values can be used to screen for proteins that work in the same neurotransmitter pathway especially when combined with a second screening method such as comparison of expression patterns. Using this method, we identified JhI-21 as a novel regulator of synaptic glutamate signaling. We found that JhI-21 is expressed in motor neurons where it regulates the developmental specificity of synaptic strength by inhibiting the clustering of post-synaptic iGluRs (Figure 10). We were also able to highlight the role of JhI-21 on late larval locomotor activity, and show that changes in the subcellular distribution of JhI-21 within motor neurons might explain the differential regulation of JhI-21 on NMJ strength and behavior.

Glutamate is the predominant excitatory neurotransmitter in the central nervous system in mammals. Thus glutamate is involved in the control of a wide range of brain functions. It is also a key player in many neurological diseases<sup>52,53</sup>. In this context glutamate transporters play a key role in regulating extracellular glutamate levels to maintain dynamic synaptic signaling processes. Therefore our identification of JhI-21 as an important actor on glutamatergic and locomotor physiology in *Drosophila* is suggesting that its possible ortholog (LAT-1<sup>36</sup>) might also have an impact on such pathways in mammals. Beside the known glutamate transporters (e.g. vGluTs loading glutamate into synaptic vesicles, and EAATs removing the excess of glutamate by surrounding glial cells)<sup>54</sup>, other transporters such as LAT-1, which are possibly not transporting glutamate could also have a major impact on glutamate receptor physiology in the mammalian nervous system. This would be a major clue to explore new strategies to cure neurological diseases.

Our data are also highlighting the potential of a new emerging technique in finding genes that co-evolve: ERC. This technology proved to be extremely powerful in the recent past to find molecular partners that interact in the same cells<sup>36</sup>. Here we show that it has also the power to decipher specific pathways such as the glutamatergic physiology and the age specific control of locomotor activity even if the products of these genes are expressed in different cell types (JhI-21 and glutamate receptors). Therefore the ERC technique would be particularly useful to reveal some pluricellular molecular networks such as the interaction between glial cells and neurons, or the plasticity of interacting neurons during development or during a learning task by identifying genes that are co-evolving. Such applications are facilitated by the ERC analysis webserver that will perform custom analysis genome-wide for user-chosen genes<sup>55</sup>.

## **Materials and Methods:**

*Calculation of evolutionary rate covariation statistics:*

ERC values were calculated as previously described<sup>36</sup>. Briefly, orthologous genes sequences from 12 *Drosophila* genomes were aligned and used to estimate gene-specific branch lengths across the species phylogeny. These branch lengths were transformed into relative rates of evolution based on the average genome-wide amount of divergence for each branch<sup>10</sup>. Rate covariation (ERC) values were calculated from the relative rates as a correlation coefficient for each gene pair. Statistical tests on groups of genes, such as the glutamate receptors, were performed by comparing the mean ERC value to 10,000 random sets of the same size using a permutation test.

*Drosophila stocks and genetics:*

Flies were grown and maintained on regular corn medium, at 25 °C, in a 12h/12h light/dark cycle. Control *Drosophila melanogaster* used in this study were *Oregon-R*, *P\*82* (precise excision of P{SUPor-P}; *JhI-21*<sup>KG00977</sup>; electrophysiology and iGluR quantification), and *w*<sup>1118</sup> (electrophysiology, iGluR quantification, and behavior). *JhI-21* mutants P{SUPor-P}; *JhI-21*<sup>KG00977</sup> (BL12970), P*JhI-21*<sup>EP1187</sup> (not available any longer at Bloomington, but still available in our laboratory), and *Df(2L)esc-P3-0* (BL3131) were previously characterized<sup>29</sup> and obtained from the Bloomington Stock Center. *JhI-21* alleles were re-balanced over *CyO-GFP*. P{*TubP-Gal4*}; LL7/*TM3*, *Sb* was obtained from Bloomington (BL5138) and re-balanced over *TM3GFP*, *Ser*. UAS-*nSyb-GFP*<sup>56</sup> provided by B. Hovemann, (Ruhr-University Bochum), *repo-Gal4* (BL7415, obtained from Bloomington), and 24-B-*Gal4* (BL1767, obtained from Bloomington), OK6-*Gal4* and OK-371-*Gal4* were provided by H. Abele (Heinrich-Heine University Düsseldorf). All genotypes used for behavioral experiments were backcrossed 5 times to an isogenized *w*<sup>1118</sup> fly stock.

*JhI-21-Gal4:*

UAS-Sequences were removed from pUAST attB<sup>57</sup> using EcoRI and HindIII. Vector was treated with Klenow fragment and religated to make attB. Heat-shock (HS) minimal promoter-, Gal4-, and hsp70 PolyA-sequence were removed from pCHS-Gal4<sup>58</sup> using NotI and cloned into attB to make Gal4 attB. JhI-21 promoter fragment was PCR amplified from genomic DNA of *Canton-S* flies by using primers, which introduced KpnI sites for cloning (underlined): GGTACCGGGATTCTTCTGCTTACCCTCT and GGTACCGCACCGATAGGAGGATGTATTC. The amplicon was subcloned to pGEM®-T Easy (Promega), re-excised and cloned to Gal4 attB using KpnI. The resulting transgenic flies were generated by site-directed integration using attB44 (provided by J. Bischof, University of Zürich). Injections were performed by Genetic Services Inc. (Sudbury, MA, USA).

*qPCR for quantification of JhI-21 expression:*

For reverse transcription RT-PCR, total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) extraction<sup>59</sup>. For the *JhI-21* expression experiments, total RNA was isolated from whole larvae. RNA (500 ng, quantified spectrophotometrically) was reverse transcribed using oligo-dT primers and standard methods. 10 % of the cDNA product was used to amplify *JhI-21* and *actin5C* cDNA fragments by PCR. A 122 fragment of *JhI-21* was amplified using the following primer pair: TTGTTTACCACGGCGAAATAG and CTTTGTGACGGAGGAGCTACA; a 200 bp fragment of *actin5C* was simultaneously amplified using CAAGCCTCCATTCCCAAGAAC and CGTGAAATCGTCCGTGACATC primer pair.

Real-time PCR was performed using an MJResearch Opticon2 real-time thermocycler and quantitative fluorescent detection of SYBR green-labeled PCR product. Relative mRNA abundance was calculated using the “ $\Delta\Delta$ CT method”<sup>60</sup>.

*Immunocytochemistry and Confocal microscopy:*



2 Rabbit polyclonal anti-JhI-21 antibodies were raised against a synthesized peptide (DGEEKIVLKRKLTLLINGVA) by Thermo Scientific/Open Biosystems, using standard methods and used at a dilution of 1:250. Both gave similar results, and we kept the one giving less background staining. The JhI-21 peptide epitope represents amino acids 30-48 of the predicted *Drosophila* JhI-21 protein. Specificity was verified on JhI-21 null mutant embryos (Figure S2).

NMJs were dissected under *Drosophila* saline supplied with 2 mM Glutamate. Glutamate present in the buffer prevents retraction of glia from the NMJ [4]. Imaging was performed on larval ventral longitudinal muscles (VLM) 6 and 7. For GluRIIA or GluRIIB stainings, NMJs were fixed 30 min in Bouin's fixative (Sigma). Immunostaining measurements of postsynaptic glutamate receptor abundance were performed as previously described<sup>4,6,31,33,61</sup>. For JhI-21 localization experiments, NMJs and larval brains were dissected in PBS + 2 mM glutamate (NMJs) or directly in fixative (brains) followed by a 30 min fixation in 4 % PFA in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C. Mouse monoclonal anti-GFP (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used at 1:200. Mouse monoclonal anti-ElaV (9F8A9) was obtained from the University of Iowa Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, US) and used either at 1:200 or at 1:500. A 1-5h washing step was performed with at least 3 solution changes, before the incubation of secondary antibodies for 2h at RT (for embryos) or overnight at 4 °C (for the rest). Dylight<sup>TM</sup>594-conjugated goat anti-Horseradish Peroxidase (HRP) antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, US) and used at 1:500. TRITC-conjugated anti-HRP antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, US) and used at 1:100. Secondary antibodies (Alexa Fluor 488 or 594 Dye) were obtained from Molecular Probes and were diluted at 1:400. Preparations were mounted in Vectashield (H-1000, Vector Labs) before imaging using a Leica TCS SP2 AOBS or an Olympus Fluoview FV500 laser scanning confocal system.

Confocal projections were scanned at 1  $\mu\text{m}$  section intervals, and were orientated and cropped with LeicaLight (also used to obtain Z-projections). Measurements of postsynaptic glutamate receptor density in confocal stacks were made by quantifying mean postsynaptic immunofluorescence intensity relative to fluorescence in surrounding muscle tissue:  $F_{\text{synapse}} / F_{\text{background membrane}}$  <sup>4</sup>.

### *Electrophysiology*

All electrophysiological recordings were obtained at 19 °C from third instar (110-120 hr after egg laying) larval ventral longitudinal muscle 6 (A3-A4) at -60 mV holding potential using two-electrode voltage clamp technique (TEVC), as previously described <sup>4,62,63</sup>.

Dissections and electrophysiology were performed under glutamate free *Drosophila* HL-3 saline <sup>4</sup>. Electrodes for TEVC were filled with 3M KCl yielding a resistance of 30-40 MOhm. Spontaneous excitatory junctional currents (sEJCs) or “minis” were detected and analyzed using Clampfit9/10 template-matching method that identifies synaptic events based on shape matching to a data-based ideal template <sup>33</sup>. Axon GeneClamp 500B/AxoClamp 900A and Digidata 1550 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) were used for data acquisition.

The bathing experiment was performed with 2mM glutamate during 24h on NMJ cultures as previously described [4].

### *Staging of feeding and wandering LIII larvae*

3<sup>rd</sup>-instar larvae were picked from the food (to obtain feeding stage larvae) or the wall (to obtain wandering stage larvae) of a stock vial and then transferred to a dish containing a piece of food for stage confirmation. Animals that stayed in the food were considered as “feeding” larvae. Larvae escaping the food were determined to be “wandering” 3<sup>rd</sup>-instar.

### *Behavior*

Staged larvae were washed in ddH<sub>2</sub>O before conducting behavioral analysis. Movement analysis was performed on a 9 cm-circular 2 %-agar-agar medium. This agar medium was used upside down to have a perfect flat surface and was placed in the middle of a bigger Pétri dish (13 cm diameter). The space between the edge of the Pétri dish and the agar was filled with ddH<sub>2</sub>O to avoid escaping larvae. A single larva was placed on the middle of the agar. Recordings and analysis were performed automatically using EthoVision XT software (Noldus information technology, Wageningen, Netherlands). Dynamic subtraction function was chosen to distinguish the larva from the background. Data collection was started two minutes after the larva was placed on the agar plate. A ten-minute movie was recorded for each individual. Speed and meander behaviors were calculated using the same software, since these parameters reflect most of the locomotor activity characteristics of larvae in our behavioral set up.

#### *Lethality and Developmental time*

Flies were allowed to lay eggs for 20 h. Approximately 3 x 100 embryos were transferred to fresh vials. 40 h after egg-laying, non-hatched embryos were counted. The amount of pupae was determined each day. After 10 days hatched adults were counted and the amount of lethality calculated.

#### *Statistics*

All data were transferred to Prism 5.0d (Graphpad) for statistical analysis and tested for normal distribution using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Two pairs of normally distributed data were analyzed using the paired-t-test. Pairs of data, which did not pass the normality test, were analyzed using the Mann-Whitney test. Three sets of not normally distributed data were analyzed by Kruskal-Wallis test; for quantification of GluRIIA and GluRIIB we compared both controls with each 'test' genotype (i.e. we did 3 comparisons

for all 5 genotypes). Normally distributed data with two nominal variables were analyzed using the two-way ANOVA followed by Bonferroni post test. Survival curves were analyzed using the Chi2 test and cumulative frequency histograms by usage of the Kolmogorov-Smirnov test.

## References

- 1 Schmid, A. *et al.* Non-NMDA-type glutamate receptors are essential for maturation but not for initial assembly of synapses at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* **26**, 11267-11277 (2006).
- 2 Schmid, A. *et al.* Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nature neuroscience* **11**, 659-666 (2008).
- 3 Li, H., Peng, X. & Cooper, R. L. Development of *Drosophila* larval neuromuscular junctions: maintaining synaptic strength. *Neuroscience* **115**, 505-513 (2002).
- 4 Augustin, H., Grosjean, Y., Chen, K., Sheng, Q. & Featherstone, D. E. Nonvesicular release of glutamate by glial xCT transporters suppresses glutamate receptor clustering in vivo. *J Neurosci* **27**, 111-123 (2007).
- 5 Chen, K., Augustin, H. & Featherstone, D. E. Effect of ambient extracellular glutamate on *Drosophila* glutamate receptor trafficking and function. *Journal of comparative physiology* **195**, 21-29 (2009).
- 6 Featherstone, D. E., Rushton, E. & Broadie, K. Developmental regulation of glutamate receptor field size by nonvesicular glutamate release. *Nature neuroscience* **5**, 141-146 (2002).
- 7 Clark, N. L., Alani, E. & Aquadro, C. F. Evolutionary rate covariation reveals shared functionality and coexpression of genes. *Genome research* **22**, 714-720 (2012).
- 8 Pazos, F. & Valencia, A. Similarity of phylogenetic trees as indicator of protein-protein interaction. *Protein engineering* **14**, 609-614 (2001).
- 9 Goh, C. S. & Cohen, F. E. Co-evolutionary analysis reveals insights into protein-protein interactions. *Journal of molecular biology* **324**, 177-192 (2002).
- 10 Sato, T., Yamanishi, Y., Kanehisa, M. & Toh, H. The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is improved by excluding the information about the phylogenetic relationships. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 3482-3489 (2005).
- 11 Lovell, S. C. & Robertson, D. L. An integrated view of molecular coevolution in protein-protein interactions. *Molecular biology and evolution* **27**, 2567-2575 (2010).
- 12 Clark, N. L., Alani, E. & Aquadro, C. F. Evolutionary rate covariation in meiotic proteins results from fluctuating evolutionary pressure in yeasts and mammals. *Genetics* **193**, 529-538 (2013).
- 13 Parmentier, M. L., Pin, J. P., Bockaert, J. & Grau, Y. Cloning and functional expression of a *Drosophila* metabotropic glutamate receptor expressed in the embryonic CNS. *J Neurosci* **16**, 6687-6694 (1996).
- 14 DiAntonio, A. Glutamate receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction. *International review of neurobiology* **75**, 165-179 (2006).

- 15 Bogdanik, L. *et al.* The *Drosophila* metabotropic glutamate receptor DmGluRA regulates activity-dependent synaptic facilitation and fine synaptic morphology. *J Neurosci* **24**, 9105-9116 (2004).
- 16 Romero-Calderon, R. *et al.* A screen for neurotransmitter transporters expressed in the visual system of *Drosophila melanogaster* identifies three novel genes. *Developmental neurobiology* **67**, 550-569 (2007).
- 17 Thimgan, M. S., Berg, J. S. & Stuart, A. E. Comparative sequence analysis and tissue localization of members of the SLC6 family of transporters in adult *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental biology* **209**, 3383-3404 (2006).
- 18 Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A., Bilderback, A. L. & Berger, E. M. The isolation of two juvenile hormone-inducible genes in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* **224**, 486-495 (2000).
- 19 Dubrovsky, E. B., Dubrovskaya, V. A. & Berger, E. M. Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology* **32**, 1555-1565 (2002).
- 20 Reynolds, B. *et al.* *Drosophila* expresses a CD98 transporter with an evolutionarily conserved structure and amino acid-transport properties. *The Biochemical journal* **420**, 363-372 (2009).
- 21 De Bundel, D. *et al.* Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J Neurosci* **31**, 5792-5803 (2011).
- 22 Williams, L. E. & Featherstone, D. E. Regulation of hippocampal synaptic strength by glial xCT. *J Neurosci* **34**, 16093-16102, doi:10.1523/JNEUROSCI.1267-14.2014 (2014).
- 23 Danjo, R., Kawasaki, F. & Ordway, R. W. A tripartite synapse model in *Drosophila*. *PloS one* **6**, e17131 (2011).
- 24 Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* **118**, 401-415 (1993).
- 25 Sudhof, T. C., Baumert, M., Perin, M. S. & Jahn, R. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. *Neuron* **2**, 1475-1481 (1989).
- 26 Bellen, H. J. *et al.* The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**, 761-781 (2004).
- 27 Parks, A. L. *et al.* Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nature genetics* **36**, 288-292 (2004).
- 28 Rorth, P. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12418-12422 (1996).
- 29 Piyankarage, S. C., Augustin, H., Featherstone, D. E. & Shippy, S. A. Hemolymph amino acid variations following behavioral and genetic changes in individual *Drosophila* larvae. *Amino acids* **38**, 779-788 (2010).
- 30 Marrus, S. B., Portman, S. L., Allen, M. J., Moffat, K. G. & DiAntonio, A. Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* **24**, 1406-1415 (2004).
- 31 Chen, K. & Featherstone, D. E. Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC biology* **3**, 1 (2005).
- 32 Chen, K., Merino, C., Sigrist, S. J. & Featherstone, D. E. The 4.1 protein coracle mediates subunit-selective anchoring of *Drosophila* glutamate receptors to the postsynaptic actin cytoskeleton. *J Neurosci* **25**, 6667-6675 (2005).

- 33 Featherstone, D. E. *et al.* An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction. *J Neurosci* **25**, 3199-3208 (2005).
- 34 Wagh, D. A. *et al.* Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**, 833-844 (2006).
- 35 Clark, N. L. *et al.* Coevolution of interacting fertilization proteins. *PLoS genetics* **5**, e1000570 (2009).
- 36 Findlay, G. D. *et al.* Evolutionary rate covariation identifies new members of a protein network required for *Drosophila melanogaster* female post-mating responses. *PLoS genetics* **10**, e1004108 (2014).
- 37 Miele, M., Boutelle, M. G. & Fillenz, M. The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. *The Journal of physiology* **497 ( Pt 3)**, 745-751 (1996).
- 38 Bradford, H. F., Young, A. M. & Crowder, J. M. Continuous glutamate leakage from brain cells is balanced by compensatory high-affinity reuptake transport. *Neuroscience letters* **81**, 296-302 (1987).
- 39 Baker, D. A., Xi, Z. X., Shen, H., Swanson, C. J. & Kalivas, P. W. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* **22**, 9134-9141 (2002).
- 40 Sato, H., Tamba, M., Ishii, T. & Bannai, S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 11455-11458 (1999).
- 41 Chillaron, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A. & Palacin, M. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *American journal of physiology* **281**, F995-1018 (2001).
- 42 Wagner, C. A., Lang, F. & Broer, S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1077-1093 (2001).
- 43 Verrey, F. *et al.* CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* **447**, 532-542 (2004).
- 44 Grosjean, Y., Grillet, M., Augustin, H., Ferveur, J. F. & Featherstone, D. E. A glial amino-acid transporter controls synapse strength and courtship in *Drosophila*. *Nature neuroscience* **11**, 54-61 (2008).
- 45 Daniels, R. W. *et al.* A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* **49**, 11-16 (2006).
- 46 Papadopoulou, D. & Louis, C. The gene coding for glutamate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical genetics* **28**, 337-346 (1990).
- 47 Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S. & Verrey, F. Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *The EMBO journal* **21**, 580-589 (2002).
- 48 Nijhout, H. F. Physiological Control of Molting in Insects *Amer. Zool.* **21** 631-640 (1981).
- 49 Meunier, N., Belgacem, Y. H. & Martin, J. R. Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by takeout in *Drosophila*. *The Journal of experimental biology* **210**, 1424-1434 (2007).
- 50 Bownes, M. & Rembold, H. The titre of juvenile hormone during the pupal and adult stages of the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *European journal of biochemistry / FEBS* **164**, 709-712 (1987).

- 51 Sliter, T. J., Sedlak, B.J. , Baker, F.C. & Schooley, D.A. Juvenile hormone in  
Drosophila melanogaster - Identification and titer determination during  
development. *Insect Biochemistry* **17**, 161-165 (1987).
- 52 Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology  
and pathology. *J Nutr* **130**, 1007S-1015S (2000).
- 53 Sundaram Sundaram, R., Gowtham L. & Nayak, B. S. The role of excitatory  
neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian Journal of  
Pharmaceutical & Clinical Research* **5**, 1, doi:82151880 (2012).
- 54 Vandenberg, R. J. & Ryan, R. M. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*  
**93**, 1621-1657, doi:10.1152/physrev.00007.2013 (2013).
- 55 Wolfe, N. W. & Clark, N. L. ERC analysis: web-based inference of gene function via  
evolutionary rate covariation. *Bioinformatics*,  
doi:10.1093/bioinformatics/btv454 (2015).
- 56 Ito, K. *et al.* The organization of extrinsic neurons and their implications in the  
functional roles of the mushroom bodies in Drosophila melanogaster Meigen.  
*Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y)* **5**, 52-77 (1998).
- 57 Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K. An optimized  
transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*  
**104**, 3312-3317 (2007).
- 58 Apitz, H. pChs-Gal4, a vector for the generation of Drosophila Gal4 lines driven by  
identified enhancer elements. *Dros. Inf. Serv* **85**, 118-120. (2002).
- 59 Roberts, D. B. *Drosophila: A Practical Approach*. (Ed2. Oxford:Oxford UP, 1998).
- 60 Horz, H. P., Barbrook, A., Field, C. B. & Bohannan, B. J. Ammonia-oxidizing bacteria  
respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of  
Sciences of the United States of America* **101**, 15136-15141 (2004).
- 61 Liebl, F. L. & Featherstone, D. E. Genes involved in Drosophila glutamate receptor  
expression and localization. *BMC neuroscience* **6**, 44 (2005).
- 62 Featherstone, D. E. *et al.* Presynaptic glutamic acid decarboxylase is required for  
induction of the postsynaptic receptor field at a glutamatergic synapse. *Neuron*  
**27**, 71-84 (2000).
- 63 Robinson, S. W., Nugent, M. L., Dinsdale, D. & Steinert, J. R. Prion protein facilitates  
synaptic vesicle release by enhancing release probability. *Human molecular  
genetics* **23**, 4581-4596 (2014).
- 64 Ryder, E., *et al.*, *The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide  
chromosomal deficiency resource*. *Genetics*, 2007. **177**(1): p. 615-29.

## Acknowledgements

We thank Pr. Bernhard Hovemann, Dr. Johannes Bischof, and Dr. Hermann Abele for providing fly stocks. We thank Serge Loquin and José Solonot for their technical help. We also thank Ingrid Adjovi and Isabelle Chauvel for conducting preliminary experiments concerning larval locomotor activity and immunostaining in Y.G.'s laboratory. Research in Y.G.'s laboratory is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the European Union (ERC Starting Grant, GliSFCo-311403), the Agence Nationale de la

Recherche (ANR-JCJC: GGCB-2010), the Conseil Régional de Bourgogne (Faber), and the Université de Bourgogne Franche-Comté. Research in D.E.F.'s laboratory was supported by the Muscular Dystrophy Association, and by the National Institutes of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Grant Nr. R01NS045628).

### **Author Contribution**

AZ performed most of the cloning necessary to obtain the *JhI-21-Gal4* allele, JhI-21 immunohistology, behavioral experiments, analyzed ERC data, and contributed to the biochemical experiments. HA did the q-PCR experiments, the GluR immunohistology, and part of the electrophysiology related to sEJCs. NC produced and analyzed the ERC data. MBG measured JhI-21 developmental time, performed the FRT based JhI-21 deletion, and helped with the behavioral experiments. MS contributed to the biochemical experiments, and assisted with the JhI-21-Gal4 allele cloning. JS performed the electrophysiological experiments related to the difference between feeding and wandering larvae, and quantified the EJCs on NMJs. FG performed the biochemical experiments and cell culture to test JhI-21 glutamate transport ability. GM helped with the behavioral experiments. AZ, DF and YG designed the general scientific strategy and wrote the article with input from all the other authors.

### **Additional information**

The authors declare no competing financial interests.

### **Figure legends**

**Figure 1. Evolutionary rate covariation. a,** The rates of evolution used in this study describe changes in protein sequences over time. To study if proteins are co-evolving, species trees were generated. In our study those trees were made by using homologue proteins of the



following species: *D.melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimillis*, *D. wilstoni*, *D. mojavensis*, *D. virillis* and, *D. grimshavi*. The rates of a pair of proteins are plotted against each other and a factor is calculated describing the correlation of these rates. The rates of co-evolving proteins (protein A and B) are positive while proteins, which are not co-evolving (protein B and C) have correlation coefficients close to zero or negative. **b**, As a positive control we calculated the global ERC value for the six glutamate receptors (mGluRA and iGluRA-E), which are known to act together at the *Drosophila* NMJ. For statistical analysis a mean correlation was calculated and compared to the mean correlation of random sets of six proteins. Next ERC values were calculated between the 39 transporter candidates and the GluRs mentioned above. Ten transporter candidates were showing robust ERC values ( $p < 0.05$ ) with each glutamate receptor. Next we compared the expression pattern of the six GluRs with the expression pattern of the putative transporters. mGluR is predominantly expressed in the CNS, iGluRs in the carcass. Twelve putative transporters were showing their highest level of expression in either the CNS or the body wall ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)), JhI-21 showed robust ERC with GluRs and was expressed highest in the same tissue than GluRs, and was chosen for further investigation. For statistical analysis the mean correlation of JhI-21 and the six GluRs was compared to a random groups of 7 proteins.

**Figure 2. Candidate amino acid transporters involved in glutamatergic transmission.**

The *Drosophila* genome encodes 39 genes showing homology to amino acid transporters (4,44). 10 of those were predicted to be co-evolving with GluRs by usage of ERC (blue) (ERC-values  $> 0.23$  and  $p < 0.05$ ). Out of those 39 putative transporter genes 11 show the highest level of expression in the same tissue as either mGluRA (highest expression in the CNS) or iGluRs (highest expression in the body wall) (green). We picked one candidate gene, JhI-21, for further analysis.

**Figure 3. JhI-21 is expressed in presynaptic motor nerve terminals.** **a**, Confocal image of third-instar larval NMJ formed on ventral longitudinal muscles 6 and 7 marked by anti-HRP (magenta) co-stained with antibodies against JhI-21 (green). **b-d**, Representative confocal projections of third-instar larval NMJs formed on ventral longitudinal muscles 6 and 7, stained with antibodies against HRP (magenta) and against GFP (green). Only *JhI-21*-Gal4 driven transgenic synapse-tethered GFP (*nSyb::GFP*) expression co-localizes with anti-HRP labeling (B). Glial (*repo*)-Gal4 or muscle (*24-B*)-Gal4 driven *nSyb::GFP* does not show co-localization with anti-HRP labeled motor-neurons. **e-f**, Ventral nerve cord (VNC) of third instar larva. (E) Cell bodies of motor-neurons marked by *OK6*-Gal4 driving the expression of membrane bound mCD8GFP (green), and are co-labeled by anti-JhI-21 (magenta). (F) Cell bodies of glutamatergic neurons marked by *OK371*-Gal4 driving the expression of membrane bound mCD8GFP (green), and are co-labeled by anti-JhI-21 (magenta). Two arrowheads are pointing two examples of cells expressing both the GFP marker and JhI-21. Scale Bar NMJ = 20  $\mu$ m. Scale Bar VNC = 40  $\mu$ m.

**Figure 4. The electrophysiological response at the muscle 6/7 NMJ is controlled by JhI-21.** **a**, Schematic representation of the *JhI-21* genomic locus. Exons are indicated by boxes, translated exons of the *JhI-21* gene by black boxes, 5' and 3' untranslated regions of the *JhI-21* gene as gray boxes. Triangles represent the inserting region of P-elements used to generate hypo-(stripped triangle) or hypermorph (grey triangle) *JhI-21* alleles. **b**, Representative traces for two-electrode voltage clamp experiments from the larval muscle 6 (LIII). As wildtype we used *w<sup>1118</sup>* (control 1) and a clean excision of P(KG00977) (control 2). **c**, Relative cumulative frequency histogram of sEJC (“mini”) amplitudes from different genotypes in third-instar *Drosophila* larvae. Rightward shift (*JhI-21 KG* and *JhI-21 KG/Dfl*, blue) indicates increase in the abundance of current-conducting postsynaptic receptors, i.e larger synaptic currents. Note

the shift to the left (i.e. decreased receptor number) in *JhI-21* overexpression mutants (gray)  $N = 6-10$  animals, 800-3.400 events measured. Kolmogorov-Smirnov test was used to compare the cumulative distributions two by two (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ). **d**, Negative correlation between the *JhI-21* mRNA levels and the number of sEJC amplitudes at the NMJ. **E**, Motor neurons were stained using anti-HRP and confocal images were taken at the 6/7 NMJ. Neither *JhI-21 KG* nor *JhI-21 KG/Dfl* showed alterations of synaptic morphology in terms of NMJ branches, bouton number, or bouton area using a Kruskal-Wallis test. Error bars represent SEM in d and e.

**Figure 5. Postsynaptic glutamate receptor immunoreactivity is inversely proportional to**

***JhI-21* expression levels.** Genotypes used are the same than the ones shown in Figure 2. **a**, *Left*, representative confocal images showing the accumulation of GluRIIA receptor subunits at the NMJ in *JhI-21* hypomorphs (*JhI-21 KG/Dfl*) compared to a control genotype control 2; *middle*, quantification of the NMJ GluRIIA and GluRIIB abundance in various genotypes; *right*, negative correlation between the *JhI-21* mRNA levels and the abundance of type-A glutamate receptor subunits at the NMJ. **b**, Immunohistochemistry of type B glutamate receptor subunits (GluRIIB) shows similar (negative) correlation with *JhI-21* transcript levels ( $N = 4-13$  animals). Error bars represent SEM; statistical test: Kruskal-Wallis test. (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

**Figure 6. Postsynaptic GluRIIC immunoreactivity is dependent on *JhI-21* expression**

**and ambient glutamate.** Bar graphs showing postsynaptic GluRIIC abundance in a control genotype (precise excision of *JhI-21 P[KG00977]*) and a *JhI-21* hypomorph allele *JhI-21 KG/Dfl*, and showing postsynaptic reduced GluRIIC abundance in *JhI-21 KG/Dfl* mutants incubated with 2 mM ambient glutamate or without for 0h or 24 hours. ( $N = 3-6$  animals per

genotype and condition). \*:  $p < 0.05$  (control compared to the other incubation times 2 by 2); \*\*:  $p < 0.01$ ; ns: not significant (Mann-Whitney tests). Error bars represent SEM.

**Figure 7. *JhI-21* mutants lack age-dependent shift in locomotor behaviors. a-b**

Parameters of locomotion were analyzed in wildtype larvae (control 1,  $w^{1118}$ ) and *JhI-21* mutants (*JhI-21 KG* and *JhI-21 KG/Df1*). **a**, right, Speed is significantly decreased in wandering wildtype larvae compared to feeding individuals. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . This difference is still present, although reduced in *JhI-21 KG* mutants. \*:  $p < 0.05$ . Difference in speed between feeding and wandering larvae is not present in *JhI-21 KG/Df1* mutants. Left, the ratio of average speed of feeding larvae/average speed of wandering larvae correlates with *JhI-21* mRNA levels. **b**, right, the meander describes amount of turnings in degree per cm and was used to characterize the turning behavior. 3<sup>rd</sup> instar wildtype larvae increase their average turning in wandering stage. \*\*:  $p < 0.01$ . Neither *JhI-21 KG* nor *JhI-21 KG/Df1* mutants show a significant change in turning behavior between both 3<sup>rd</sup>-instar larval stages. Left, the ratio of average meander of feeding larvae/average speed of wandering larvae shows negative correlation with *JhI-21* mRNA levels. **c**, *JhI-21* mutants show no difference in lethality or developmental time as compared to the control genotype. Statistical test in a and b: 2-Way-ANOVA,  $N = 30$ , Error bars represent SEM. Statistical test in c Mantel-Cox test:  $N = 131-334$  per genotype.

**Figure 8: The age-dependent shift in electrophysiological response at the muscle 6/7**

**NMJ is controlled by *JhI-21*.** Cumulative frequency histograms of sEJC (“mini”) amplitudes from third-instar feeding and wandering *Drosophila* larvae. Leftward shift in wandering control animals indicates an age-dependent decrease in the abundance of current-conducting postsynaptic glutamate receptors, i.e smaller synaptic currents. This shift is inverted to rightward in the *JhI-21 KG/Df1* allele.  $N = 4-5$  animals (representing 10-17 NMJs), 2400-

3600 events measured per phenotype; Statistical test: Kolmogorov-Smirnov test (\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ).

**Figure 9. JhI-21 is differentially expressed in the nervous system of feeding and wandering 3<sup>rd</sup>-instar control larvae.** **a-b**, Confocal projection of *w<sup>1118</sup>* 3<sup>rd</sup>-instar larval VNC stained with anti-JhI-21 (magenta) and NC82 antibody (green). **c-d**, Quantification of signal intensity reveals higher expression of JhI-21 in the ventral nerve cord of feeding larvae compared to wandering ones (\*\*:  $p < 0.01$ ,  $N = 12$ , Mann Whitney test). Intensity of nc82 does not change between these larval stages ( $N = 12$ , unpaired t-test). **e-f**, Confocal images of third-instar larval (LIII) NMJs of muscles 6 and 7, stained with antibodies against HRP (stains all neuronal membrane, green) and JhI-21 (magenta). At the NMJ anti-JhI-21 labeling is detectable at wandering stage, not at feeding stage. Scale Bar (brains) = 40  $\mu$ m. Scale Bar (NMJs) = 20  $\mu$ m. Error bars represent SEM in c and d.

**Figure 10. JhI-21 co-evolved with glutamate receptors, and regulates strength of glutamatergic signaling at the larval NMJ.** JhI-21 is expressed in motor neurons together with mGluRA, and regulates synaptic strength by inhibiting the clustering of iGluRs at the postsynaptic muscle cell specifically during the wandering stage in third-instar larvae. The schematic representation illustrates two possible functions of JhI-21 on iGluR clustering in wandering larvae. On the left is shown the direct export of glutamate close to the synapse, which inhibits iGluR clustering. On the right, an indirect action of JhI-21 is proposed through the transport of leucine. Leucine acts on the activity of the Glutamate dehydrogenase (Gdh), which can reciprocally catalyze the production of  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) to glutamate within the motoneuron. Glutamate then could be released to the hemolymph surrounding the NMJ via an unidentified transporter, and act on iGluR clustering.

## Tables

**Table 1. Glutamate receptors show overall positive ERC values and highest expression**

**in the CNS or the body wall.** The table shows the grouped ERC value of all six glutamate receptors together and its corresponding *p*-value. The positive ERC value indicates the strength of evolutionary covariation between all 6 GluRs. The larval expression pattern of the glutamate receptors according to Flyatlas ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)) is summarized as followed: X = low expression (10 – 99), XX = moderate expression (100 – 499). Tissues are abbreviated as followed: central nervous system (CNS), digestive system (DS), malpighian tubules (MT).

Gene	ERC Data		GluR expression pattern					
	ERC value	<i>p</i> -value	CNS	Body wall	DS	MT	Fat body	Trachea
mGluR	0.556	0.00021	X					
GluRIIA				XX	X	X		
GluRIIB			X	X	X	X		
GluRIIC				XX	X			
GluRIID				XX	X			
GluRIIE				XX	X			

**Table 2. Co-evolution of putative transporter genes with glutamate receptors and**

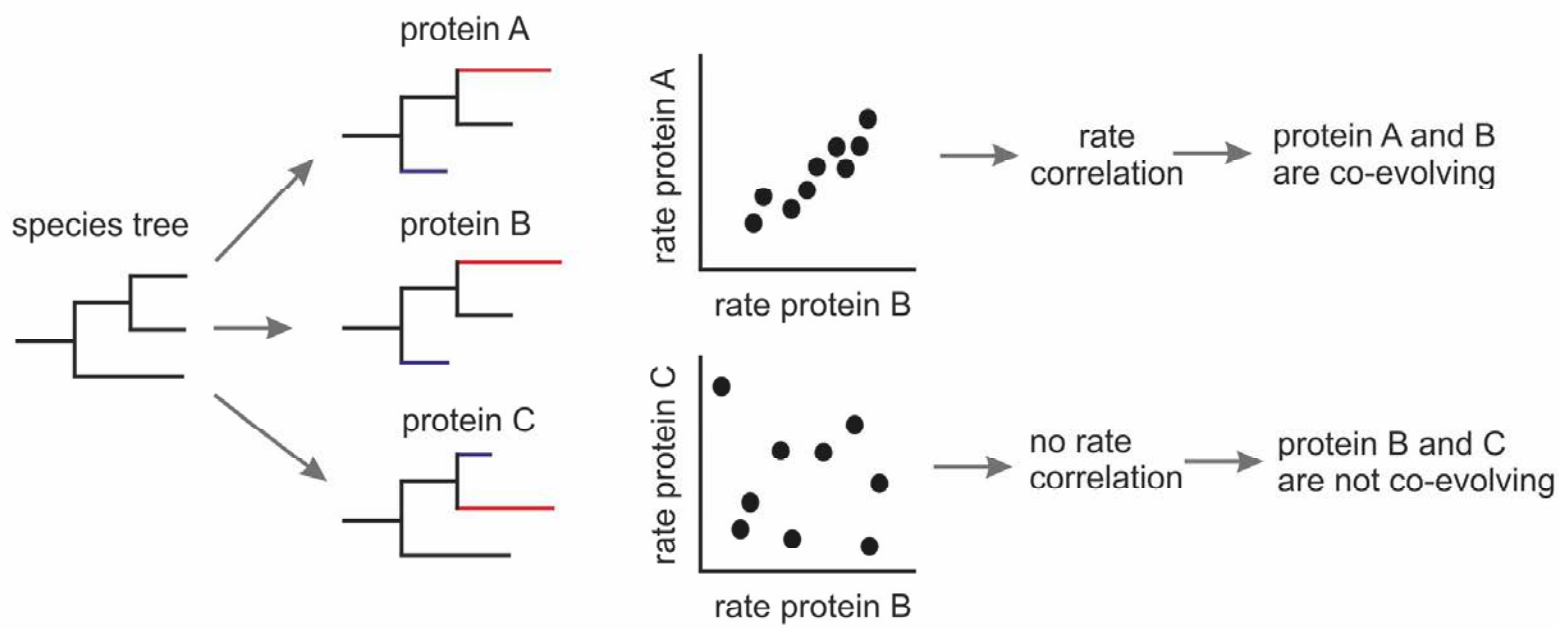
**summary of their larval expression pattern.** The table shows group ERC values of 39 putative amino acid transporters and glutamate receptor subunits (mGluRA, GluRIIA, GluRIIB, GluRIIC, GluRIID, and GluRIIE) with their corresponding *p*-values. The magnitude of positive ERC values indicate the strength of evolutionary covariation between the amino acid transporter and the 6 GluRs. The expression pattern according to Fly Atlas ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)) is summarized as followed: X = low expression (10 – 99), XX = moderate expression (100 – 499), XXX = high level expression (500 – 999), XXXX = very high expression (> 999). Tissues are abbreviated as followed: central nervous system (CNS), digestive system (DS), malpighian tubules (MT).

Transporter	ERC Data		Transporter expression pattern					
	ERC value	<i>p</i> -value	CNS	Body wall	DS	MT	Fat body	Trachea
bdg	0.465	0.0001	X	X	X	X	X	X
CG8785	0.3828	0.0007			XXXX	XX		X
CG13384	0.4405	0.0007	XX	XX	XX	XX	XXX	XX

<b>JhI-21</b>	0.3788	0.0019	<b>XXX</b>	XX	XX	X	X	XX
CG16700	0.4073	0.0023	X	XX	XX	X		X
CG9413	0.305	0.0028	XX	XXX	XXXX	X		X
CG7255	0.4127	0.0045		X	X	X	X	
DAT	0.3223	0.0075	X					
mnd	0.2603	0.0122	XX	XX	X	XX	X	X
CG13795	0.23	0.0467		X	X	X	<b>XXXX</b>	
blot	0.183	0.0624	XX	XXX	XX	XX	X	XXX
ine	0.1678	0.0737	X	X	<b>XXXX</b>	XX		
gb	0.1493	0.1334	<b>XXX</b>	X	XX	X	XXX	X
CG1698	0.1077	0.2114		X	<b>XXX</b>	X		X
CG32079	0.107	0.2472						
VGlut	0.0648	0.2617	X					
CG43066	0.0193	0.4055						
SerT	0.0298	0.4108	X		X			
CG5535	0.0737	0.4433	XX	XX	XX	X	X	XX
CG4476	-0.0002	0.597	<b>XX</b>		X			
CG15279	-0.0185	0.6095		XX	X	<b>XXXX</b>		XX
CG13796	-0.0432	0.6126	X	XX	XX	X	<b>XXXX</b>	XX
CG4991	-0.063	0.7208		X	<b>XX</b>			X
CG12531	-0.072	0.600						
NAAT1	-0.0828	0.739			XX	XX		
Eaat1	-0.087	0.74	<b>XXX</b>		XX	X	XX	
path	-0.0598	0.797	<b>XXX</b>	XX	XX	X	XX	X
CG5549	-0.1158	0.8007						
slif	-0.1537	0.9087		XX	XXX	<b>XXXX</b>		X
CG7888	-0.1735	0.929	XX		X	<b>XXX</b>		
Vmat	-0.1715	0.9422	<b>XXX</b>		XX			
CG8850	-0.227	0.9604		X		XXX	XXX	
CG15088	-0.2275	0.9631	X		X	<b>XX</b>		
CG1139	-0.2303	0.9736		XXX	X	XXX		X
VGAT	-0.2725	0.9929	<b>X</b>					
CG1607	-0.3837	0.9988	<b>XXXX</b>	XX	XX	XX	XXX	XX
CG13248	-0.434	0.9998	<b>XX</b>		X			
CG10804	-0.435	0.9999	<b>XX</b>					
Eaat2	-0.5347	1.00	<b>XXX</b>					

a

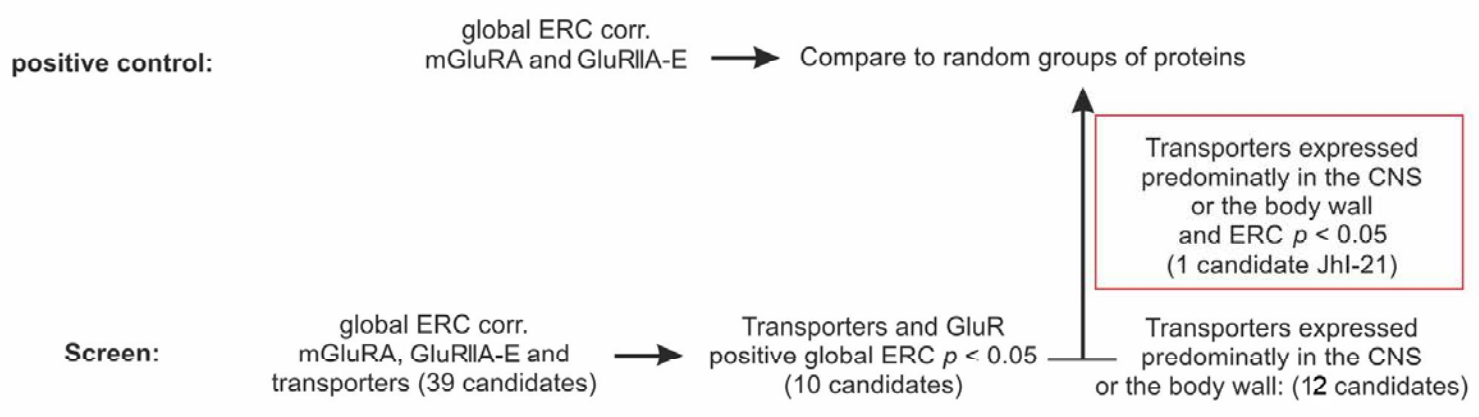
### Principle of evolutionary rate covariation (ERC)



b

### Flow chart:

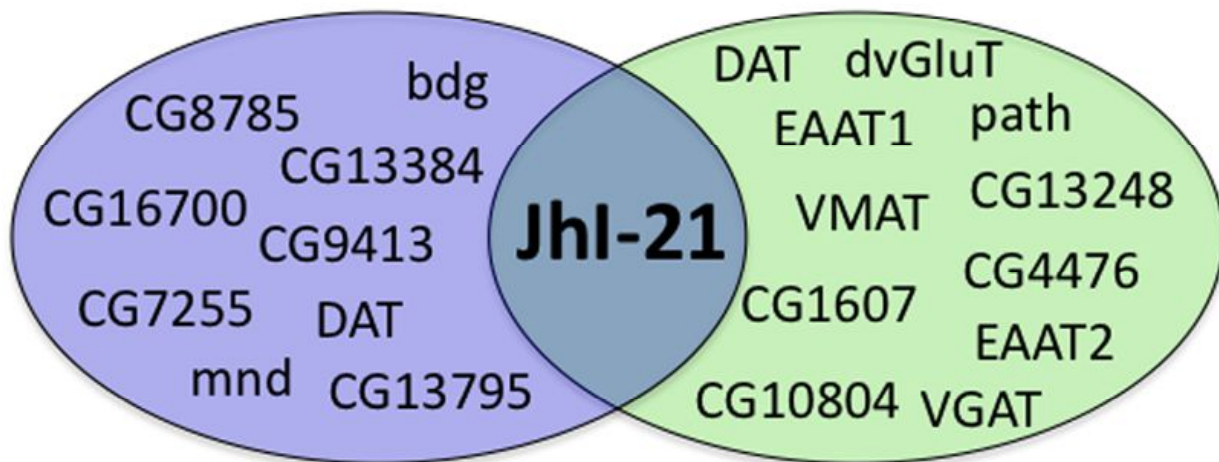
### screening for transporters involved in glutamateric signaling using ERC

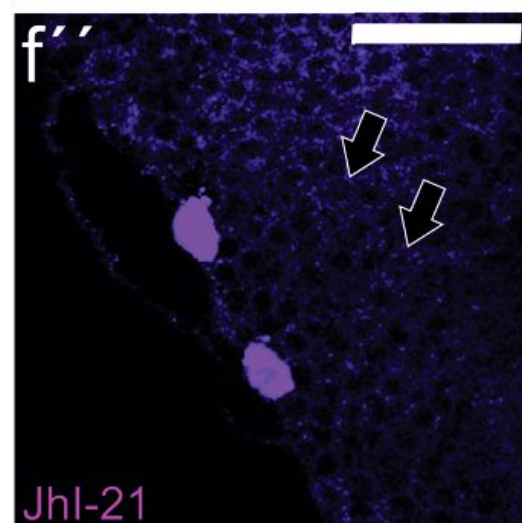
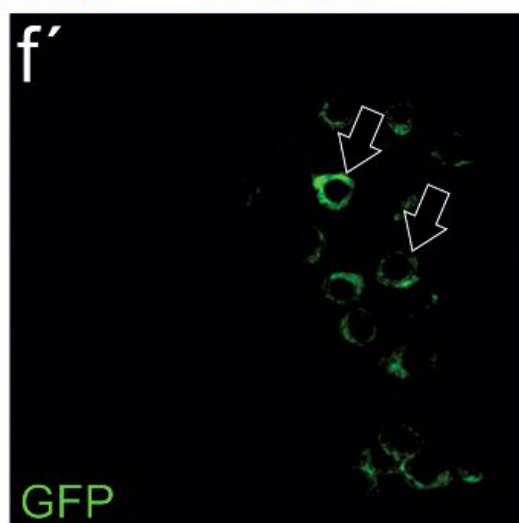
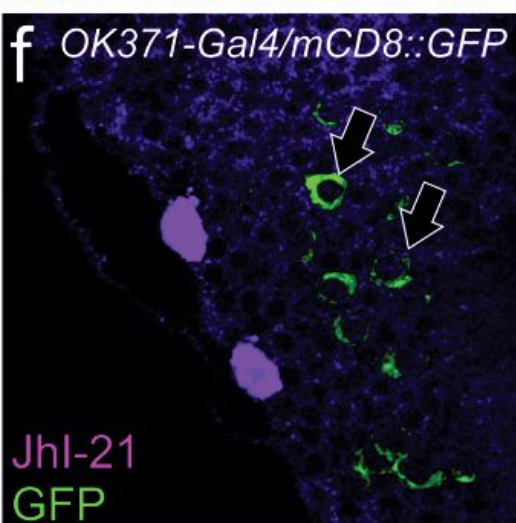
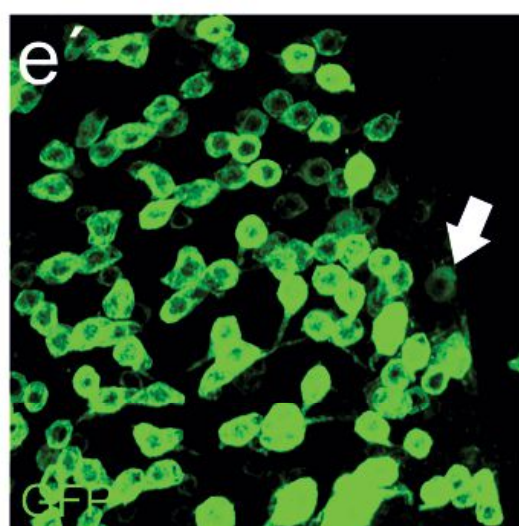
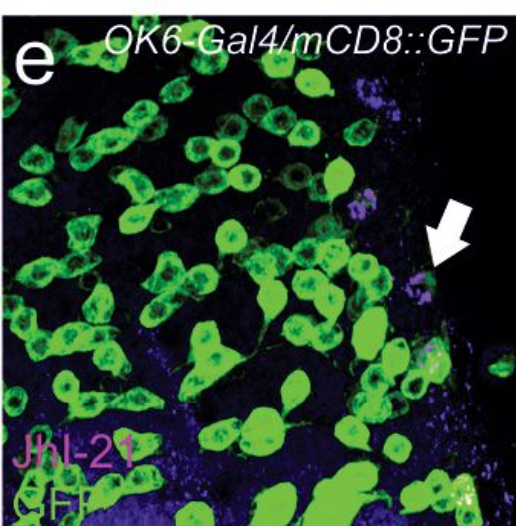
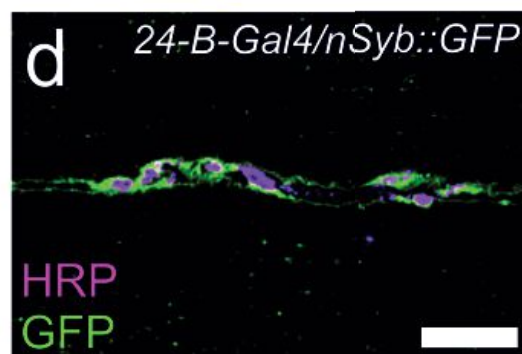
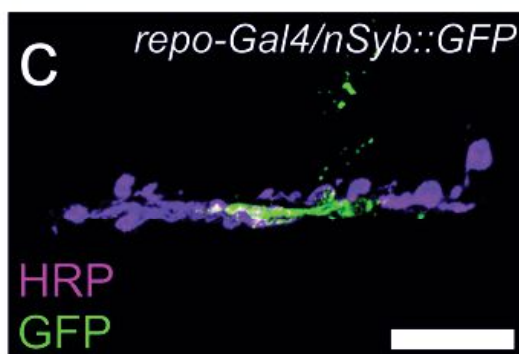
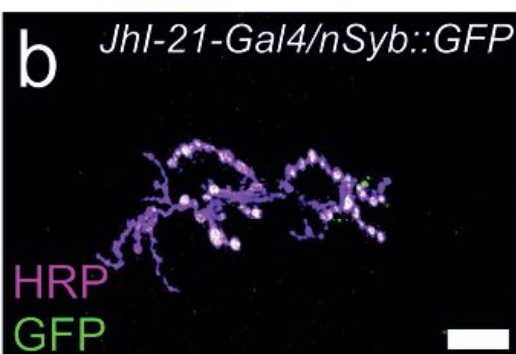
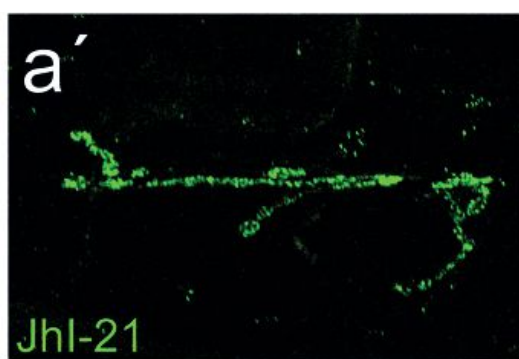
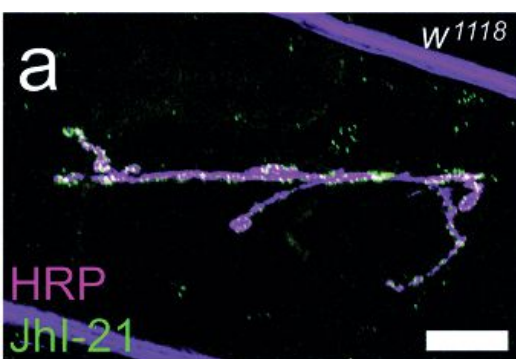


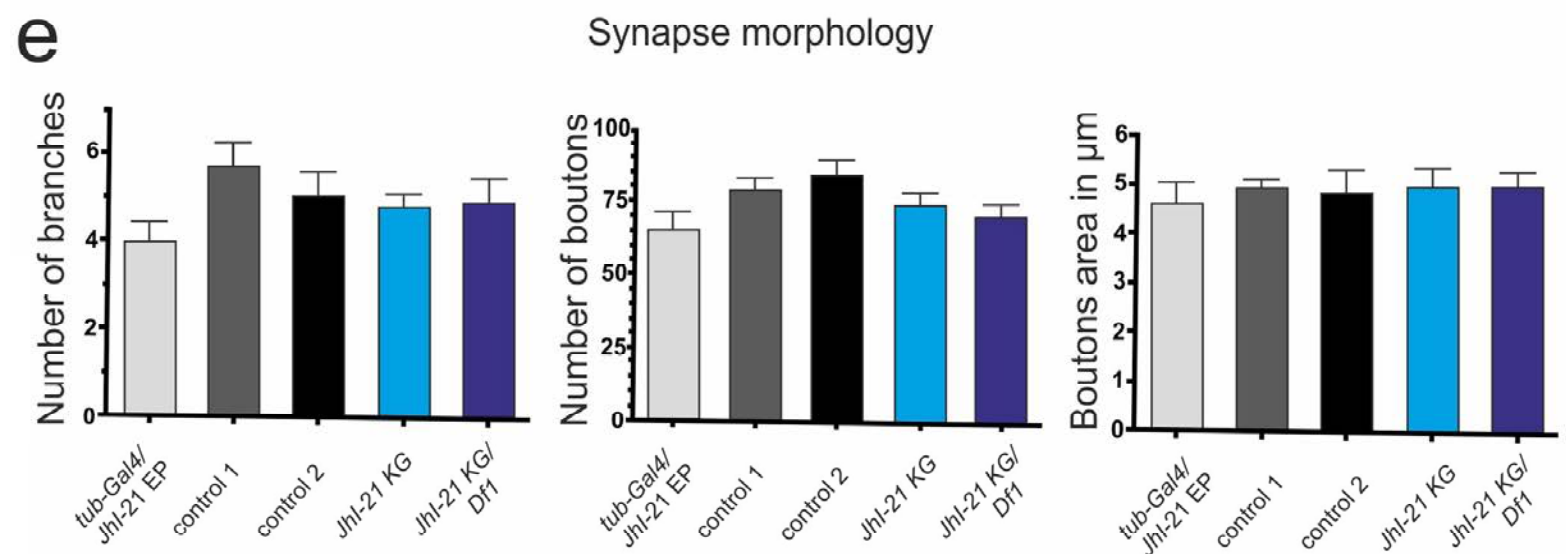
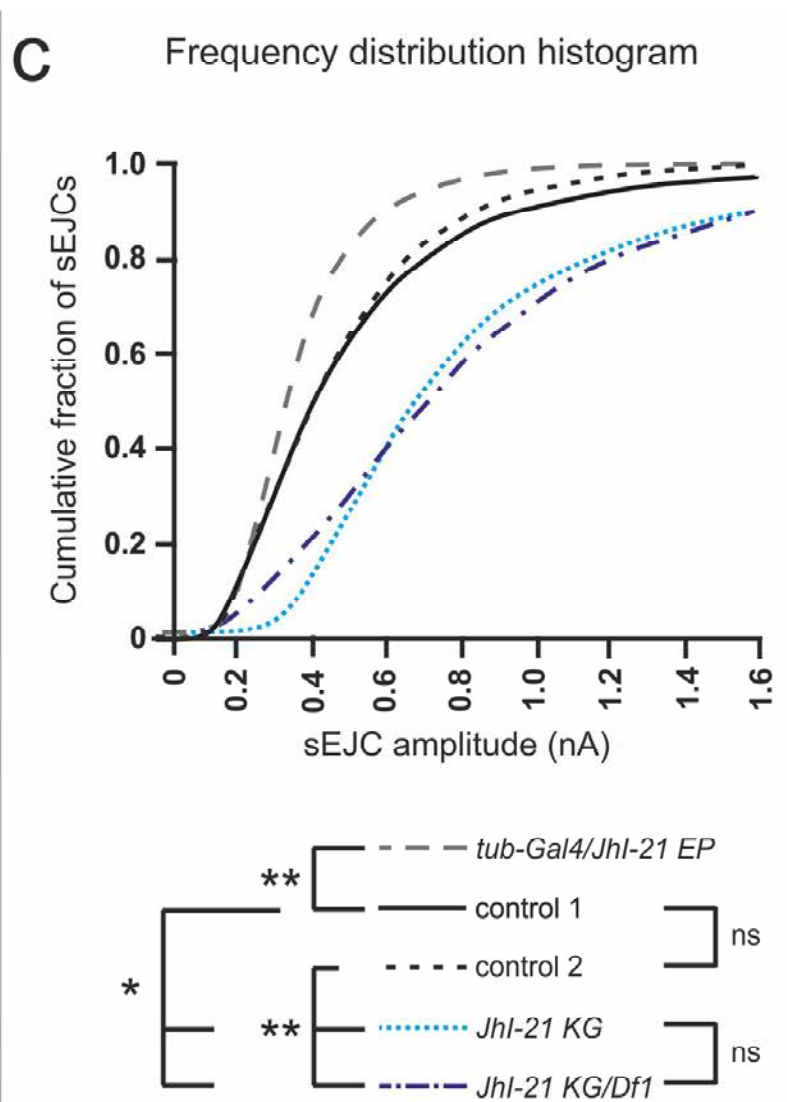
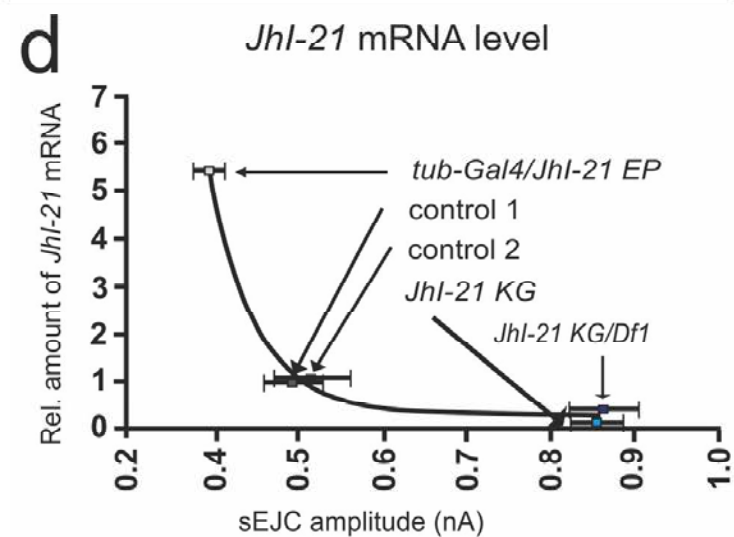
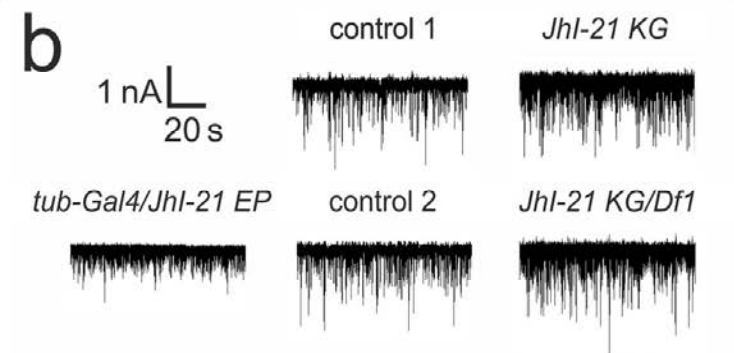
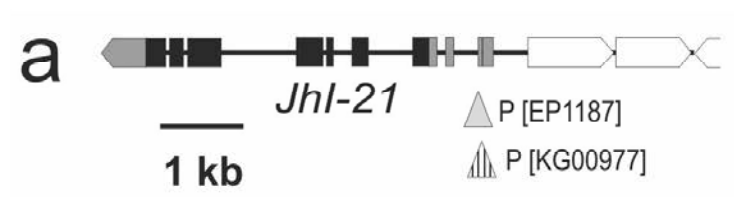


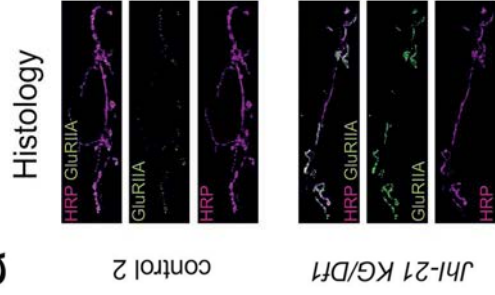
Co-evolution with GluRs

Expressed in neuromuscular system

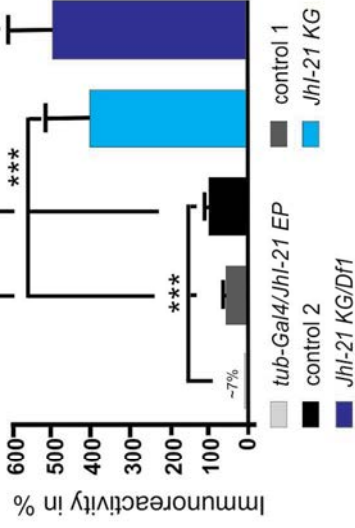
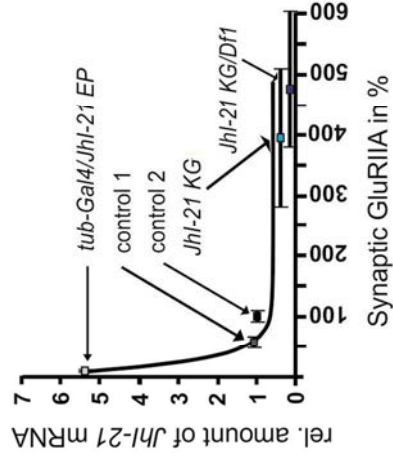
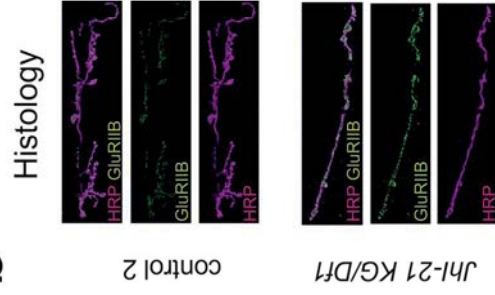




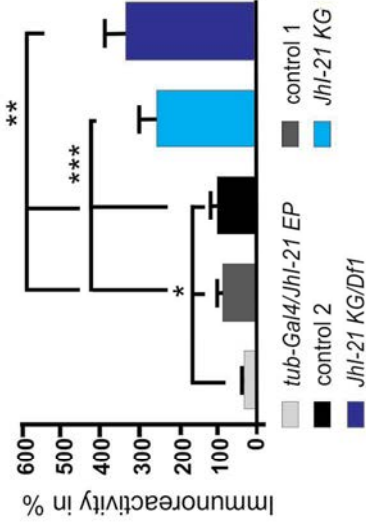
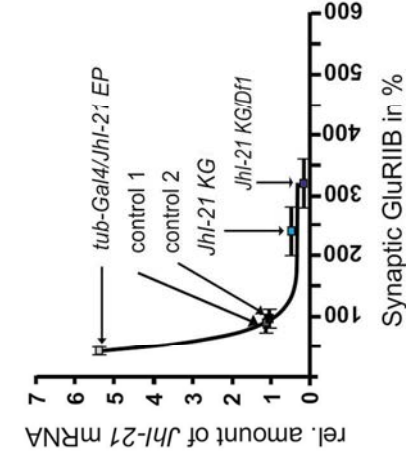


**a****GluRIIA Immunoreactivity**

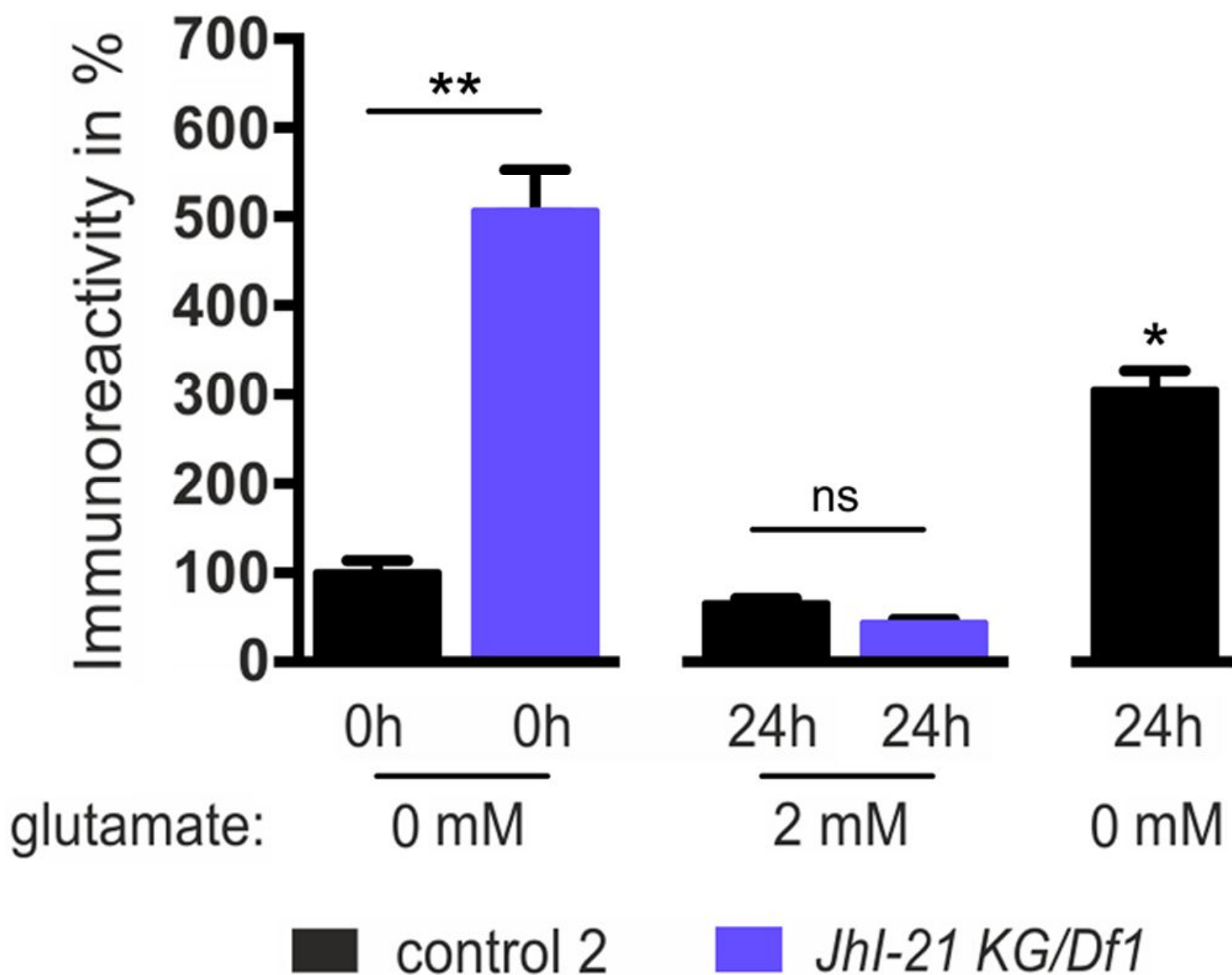
## Quantification

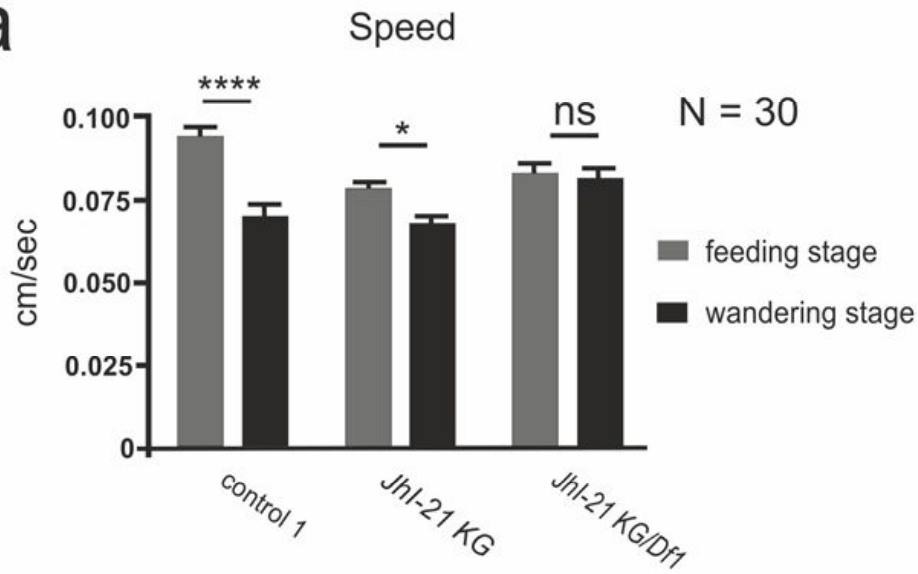
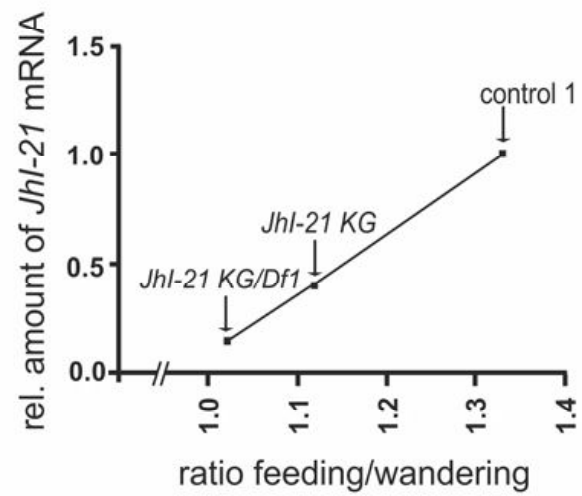
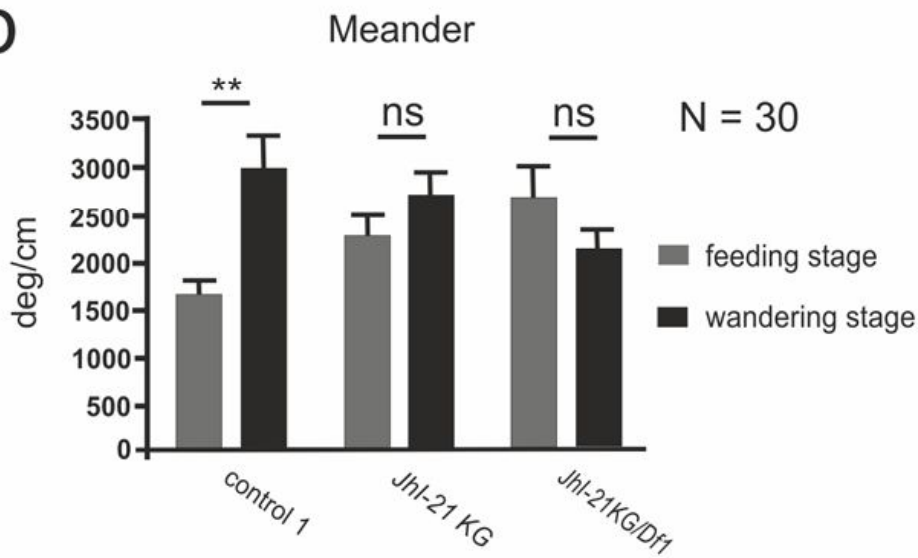
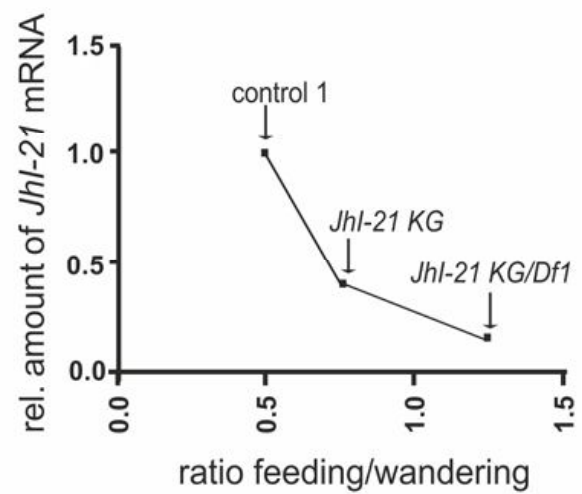
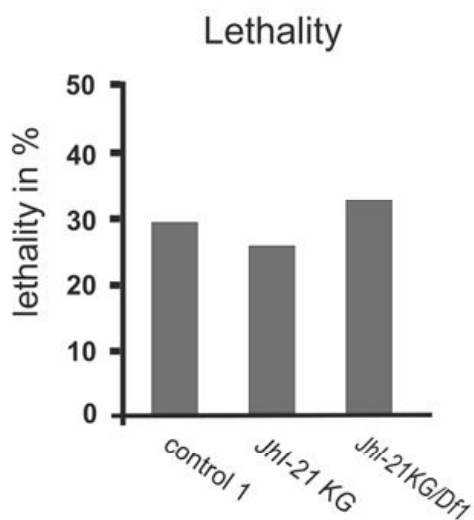
Correlation with *Jhl-21* mRNA**b****GluRIIB Immunoreactivity**

## Quantification

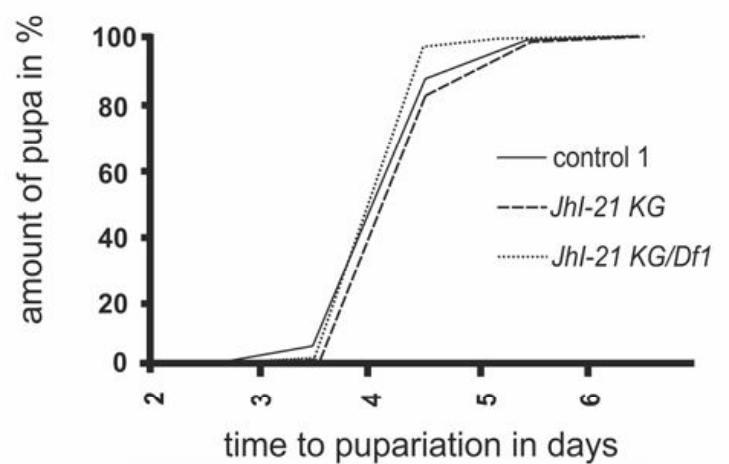
Correlation with *Jhl-21* mRNA

## GluRIIC Immunoreactivity

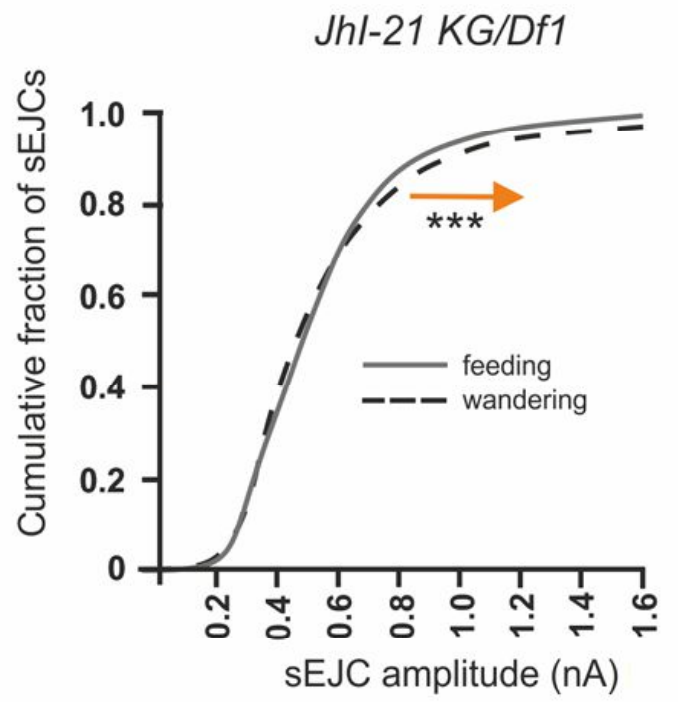
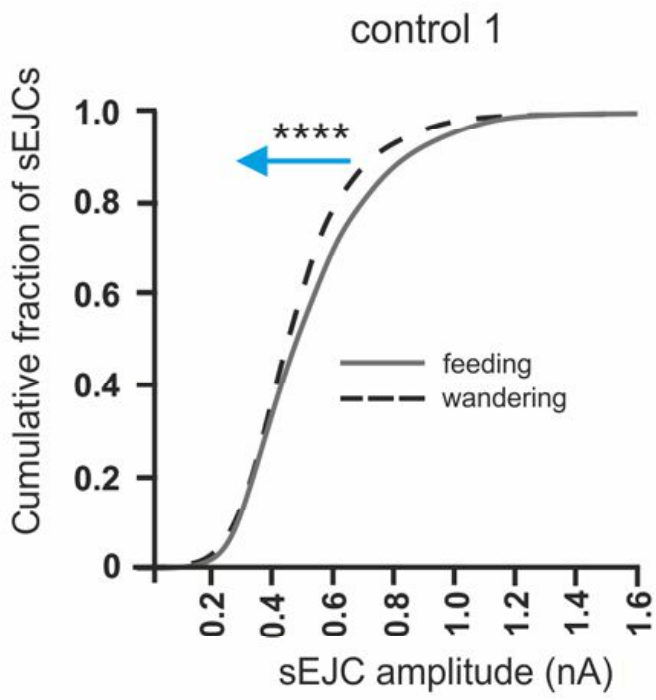


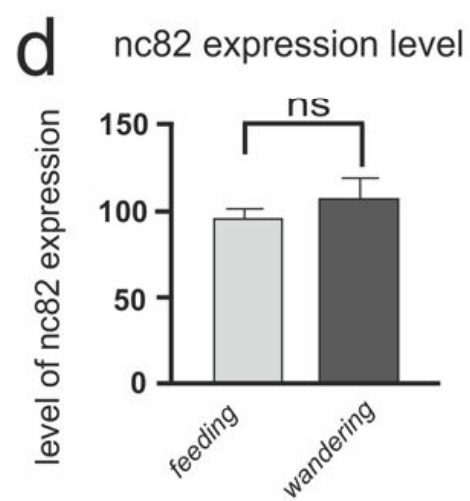
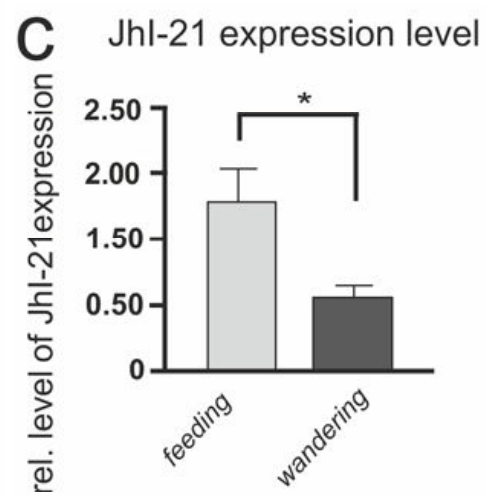
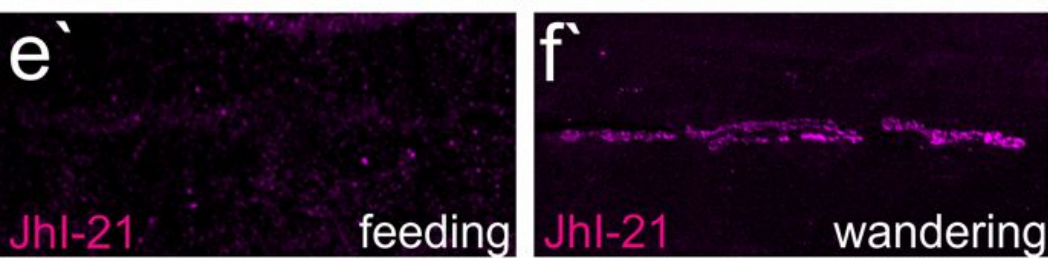
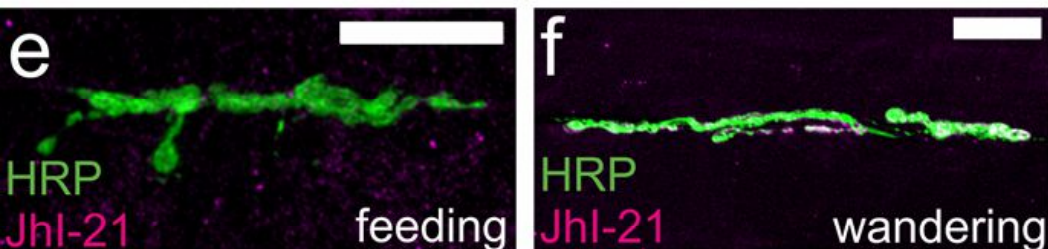
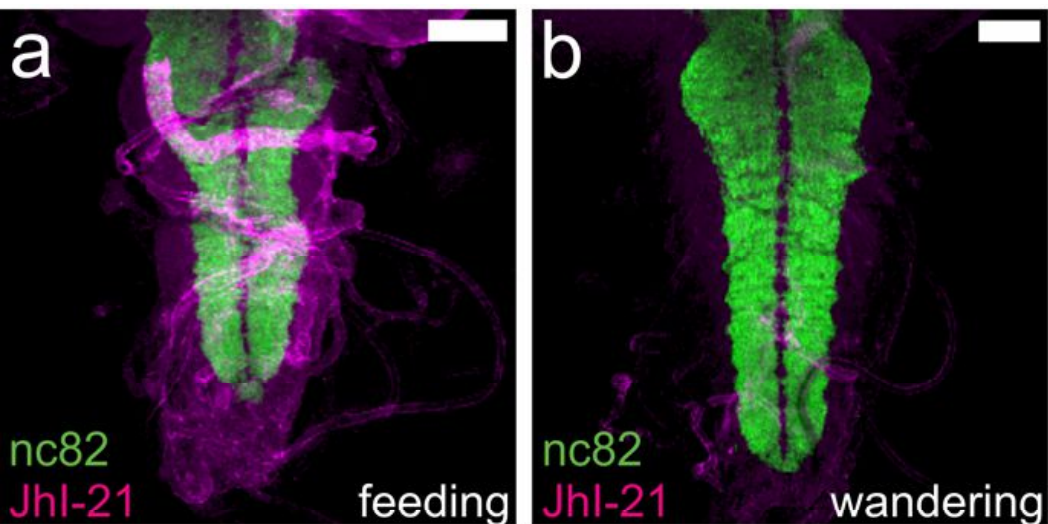
**a**Correlation with *Jhl-21* mRNA**b**Correlation with *Jhl-21* mRNA**c**

Developmental time



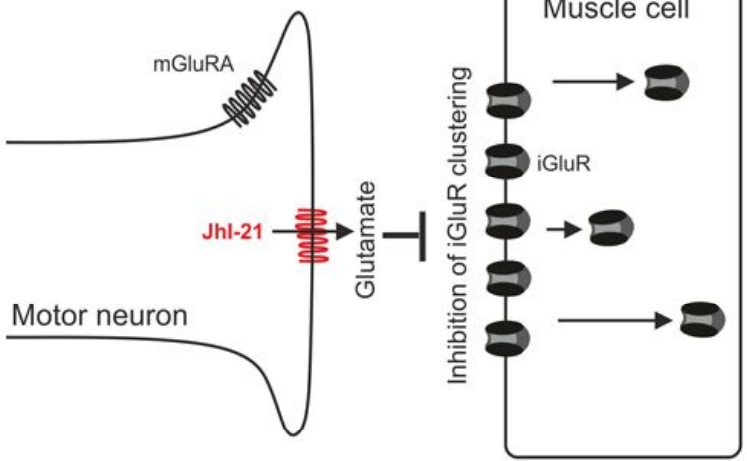
### Frequency distribution histogram



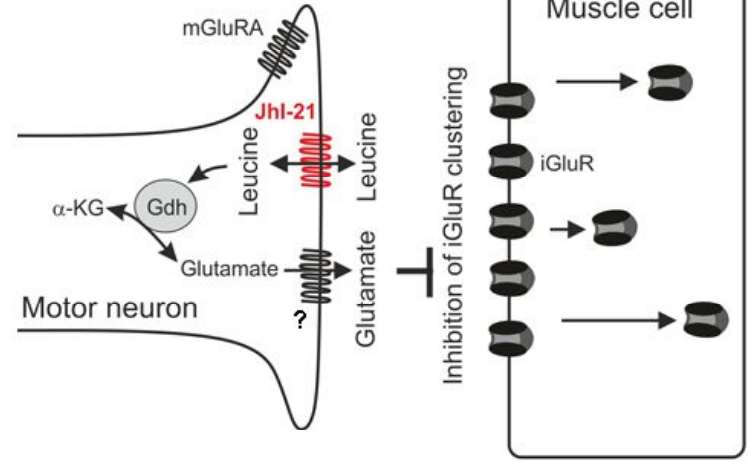




### direct action



### indirect action





## **Rôle du transporteur d'acides aminés Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux chez *Drosophila melanogaster***

Les acides aminés ont de nombreuses fonctions dans l'organisme en plus de leur rôle comme constituants élémentaires des protéines. Ils peuvent par exemple servir de neurotransmetteur ou de signal pour l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Leur passage à travers la membrane plasmique est facilité par des transporteurs de la famille des protéines SLC.

Les transporteurs hétérodimériques d'acides aminés HAT appartiennent aux SLC. Les HAT sont constitués d'une chaîne légère SLC7 assurant la spécificité de transport et d'une chaîne lourde SLC3 impliquée dans l'adressage du complexe protéique à la membrane.

Ma thèse a porté sur l'étude du rôle d'un homologue de SLC7 chez la drosophile, Minidiscs (Mnd), dans le fonctionnement du système nerveux. Mnd appartiendrait aux transporteurs du système L, principalement connus pour leur rôle dans la prolifération cellulaire.

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence la localisation de Mnd dans le cerveau de drosophile dans certains neurones (corps pédonculés, neurones dopaminergiques) et dans certaines cellules gliales (glie corticale). La présence de Mnd dans le cerveau semble intervenir dans la modulation de certains comportements, tels que le réflexe de géotaxie négative. Ces travaux ont aussi montré que, comme les HAT de mammifères, Mnd s'associe de façon covalente à un partenaire protéique. Les expériences de transport semblent par ailleurs confirmer l'appartenance de Mnd au système L.

Ces résultats suggèrent que Mnd est probablement impliqué dans la régulation de l'activité neuronale et donc dans le fonctionnement du système nerveux, ce qui n'avait encore jamais été décrit pour un transporteur du système L.

Mots-clés : transporteur d'acides aminés, HAT, SLC7, système L, Minidiscs, système nerveux, drosophile.

## **Role of the amino acid transporter Minidiscs in the nervous system process in *Drosophila melanogaster***

Amino acids have many functions in the body in addition to their role as basic constituents of proteins. They can for example serve as a neurotransmitter or signal for the activation of intracellular pathways. Carriers of the SLC protein family facilitate their path through the plasma membrane.

The heterodimeric amino acid transporters HAT belong to SLC proteins. HAT are composed of a light chain SLC7 ensuring the specificity of transport and a heavy chain SLC3 involved in the addressing of the protein complex to the plasma membrane.

My thesis focused on studying the role of a SLC7 homologue in drosophila, Minidiscs (Mnd), in the functioning of the nervous system. Mnd might belong to system L carriers, mainly known for their role in cell proliferation.

My thesis work led to highlight the location of Mnd in the drosophila brain in some neurons (mushroom bodies, dopaminergic neurons) and some glial cells (cortical glia). The presence of Mnd in the brain seems to be involved in the modulation of some behaviors such as negative geotaxis reflex. This work also showed that, as for mammal HAT, Mnd is associated covalently to a protein partner. Transport experiments seem also to confirm the belonging of Mnd to the system L.

These results suggest that Mnd is probably involved in the regulation of neuronal activity and thus in the functioning of the nervous system, which had never been described for a system L carrier.

Keywords: amino acid transporter, HAT, SLC7, system L, Minidiscs, nervous system, drosophila.