



HAL
open science

Etude du rappel des Mémoires à Long Terme chez *Drosophila melanogaster*

Ghislain Belliart-Guerin

► **To cite this version:**

Ghislain Belliart-Guerin. Etude du rappel des Mémoires à Long Terme chez *Drosophila melanogaster*. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066199 . tel-01552456

HAL Id: tel-01552456

<https://theses.hal.science/tel-01552456>

Submitted on 3 Jul 2017

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 Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau-Cognition-Comportement ED158

Laboratoire Plasticité du Cerveau

Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire

Etude du rappel des Mémoires à Long Terme chez *Drosophila melanogaster*

Thèse de doctorat en Neurosciences

Ghislain BELLIART-GUERIN

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Présentée et soutenue publiquement le 02/07/2015, devant un jury composé de :

Dr Yaël Grosjean

Rapporteur

Dr Jean-René Martin

Rapporteur

Dr Jean-Maurice Dura

Examineur

Dr Patricia Gaspar

Examinatrice

Dr Pierre-Yves Plaçais

Examineur

Dr Thomas Prétat

Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : Dr Yaël Grosjean, Dr Jean-René Martin, Dr Jean-Maurice Dura et Dr Patricia Gaspar.

Je remercie ensuite Thomas de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir toujours proposé des projets ambitieux. J'ai apprécié son implication dans les projets et la fréquence de nos réunions, à laquelle il tient. Ces réunions ont très souvent été source d'intense réflexion, et m'ont permis de développer mon sens scientifique et de me forger une culture drosophiliste. Je le remercie également pour m'avoir encouragé à participer à différents congrès qui ont été très stimulants et m'ont poussé à me dépasser. Enfin, je le remercie d'avoir, par son exigence, contribué à améliorer mon organisation et mon efficacité.

Je remercie Pierre-Yves de m'avoir co-encadré, de m'avoir formé aux techniques d'imagerie in vivo et de m'avoir aidé à parfaire ma pratique expérimentale. Je le remercie également de m'avoir guidé dans ma réflexion scientifique durant ces quatre années et de n'avoir pas ménagé sa peine quand il s'est agi de perfectionner mes présentations orales et mes productions écrites, dont mon manuscrit de thèse. J'ai apprécié sa concision m'ayant conduit à développer mon autonomie et mon efficacité dans le travail, pratique ou théorique.

Je remercie l'équipe GDSM, passée et présente, dans son ensemble pour l'ambiance de travail somme toute pas désagréable, et pour les interactions qu'elle a pu nourrir. Les échanges quotidiens ont été humainement enrichissants et ce fût un défi réjouissant de composer avec les caractères différents et affirmés de mes collègues. « Valérie, j'espère que ma musique finira par te manquer ! »

De même, je remercie l'ensemble du laboratoire de Neurobiologie pour les bons moments passés, en particulier au balcon à café, et lors des deux retraites auxquelles j'ai participé. Je remercie en particulier Alexandre, Honorine, Daniela, Aurélie, Danae, Malika, Marcel, Camille, Oriane, Maureen, Karim, Julie, Thierry, Hélène, Laure, Baya, Serge, Mathilde, Noelia pour tous les sourires et mots sympas du quotidien (et tous ceux que je n'ai pas cités mais qui sont là aussi !). Je remercie aussi Abdoul (le japonais), Matthieu (le danseur philosophe), Sophie (la réfléchie), Alexandra (la pipelette) et Eloïse (la curieuse) pour leur amitié et les discussions qui font du bien. Je remercie également Amandine pour ce qu'elle m'a apporté.

Remerciements

Je remercie les anciens, les mentors : Eric, Alex, Séverine, Quentin, Anne-Lise, Marlène et Guillaume qui ont été chaleureux, encourageants et surtout amicaux. Je remercie en plus Alex pour m'avoir bousculé et Quentin pour la musique. Une pensée toute particulière pour Eric, mon « Split », avec qui j'ai beaucoup partagé et qui a su me prévenir du « burnout » :-). « I wanna jam it with you ! »

Je remercie la musique, le chant et la playlist Marcello qui m'ont aidé à supporter les heures passées dans les salles de comportement. J'espère que les tympanes que j'ai pu blesser me pardonneront.

Je remercie les copains qui me sont chers hors du labo, ayant toujours bien ri quand je leur parlais de mouches (vous avez dit sexy ?), mais qui ont aussi été d'appréciables oreilles.

Je remercie les Jeudis Bière et tous les gens qui y ont gravité, ainsi que les recoins les plus obscurs de l'ESPCI.

Je remercie toute ma famille. Et surtout mes parents qui m'ont encouragé, m'ont conseillé et m'ont aidé. Leur intérêt pour tout ce que j'ai fait dans mes études, et par-dessus tout cette thèse, n'a jamais faibli et a toujours contribué à me rendre fier de ce que je faisais, et j'ai hérité de cette curiosité qui les caractérise. « J'espère que vous avez tout compris de ma thèse ! »

Je remercie énormément les copains, les grands copains : Emna, Marie, Raouf, Lisa, Leïore et Gaëtan, ainsi que PYM et Isa, avec qui tout a commencé. Pour toutes les aventures, les discussions, les rigolades, les émotions et les conneries que nous avons vécues tous ensemble. «Merci pour tout. »

Enfin, je remercie infiniment Heidi qui m'a aidé à prendre confiance en moi, qui m'a stimulé, m'a apaisé et qui m'a aidé à faire la part des choses entre boulot et vie personnelle. Et merci pour tout le reste. « あなたはラマ (ラマ僧) を養子にしないことを望みますか? »

Par contre, je me donne encore un peu de temps avant de décider si je remercie ou non la mouche, qui a été si (trop) mystérieuse et si capricieuse...

Résumé

Le cerveau de la drosophile est le siège de processus neuronaux complexes, et la drosophile se révèle être un organisme de choix pour leur étude grâce en particulier aux puissants outils de génétique moléculaire. Une drosophile peut former une mémoire olfactive associative aversive ou appétitive, selon qu'une odeur est associée à une punition ou à une récompense. En aversif, si le conditionnement est répété au moins cinq fois avec intervalles de repos, la mémoire se consolide en impliquant une synthèse protéique *de novo* et peut alors durer plus d'une semaine : on parle de mémoire à Long Terme (MLT). Dans le cadre du paradigme appétitif, il existe également une MLT dépendant de la synthèse protéique *de novo*, mais sa formation est engagée dès le premier cycle d'apprentissage.

Les Corps Pédonculés sont le centre cérébral où est encodée la mémoire olfactive et comprennent 4000 neurones, les Cellules de Kenyon (KC). Ils sont contactés par environ 150 neurones de projection cholinergiques leur apportant l'information olfactive, mais également par environ 130 neurones dopaminergiques afférents et seulement 34 neurones efférents. Beaucoup des neurones impliqués dans la formation et le stockage des mémoires olfactives ont été identifiés au cours des 15 dernières années. Le premier objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier précisément quels neurones encodent la MLT au sein des Corps Pédonculés et quels neurones convoient l'information mnésique hors des Corps Pédonculés. Pour ce faire, nous avons mis à profit des outils thermogénétiques permettant de bloquer la transmission synaptique de neurones choisis, et ce à un moment donné des processus mnésiques. Après avoir induit la formation de MLT aversive ou appétitive, il nous est possible d'inhiber les KC ou les neurones efférents aux Corps Pédonculés lors de la remobilisation, 24 heures après le conditionnement, des informations enregistrées. Ensuite, pour comprendre la physiologie des neurones identifiés, c'est à dire comment leur activité leur permet d'assurer leur fonction dans la mémoire, nous révélons leur activité grâce à une sonde calcique fluorescente exprimée génétiquement et nous enregistrons cette activité *in vivo* par microscopie confocale. Pour mimer les conditions de rappel de la MLT, nous représentons l'odeur ayant servi au conditionnement à des drosophiles ayant formé une MLT.

En collaboration avec le groupe de Gerald Rubin (Janelia Farm Research Campus, USA), nous avons mis à profit une collection de 80 lignées de drosophiles permettant de cibler chacun des 49 types de KC et neurones extrinsèques aux CP avec une résolution de l'ordre du neurone unique grâce à la stratégie intersectionnelle « Split-Gal4 ». J'ai réalisé le criblage systématique de leur implication dans le rappel des MLT aversives ou appétitives. J'ai ainsi pu

Résumé

confirmer le rôle prépondérant que jouent les KC de type α/β dans le rappel de la MLT aversive et de la MLT appétitive, en attribuant même pour cette dernière un rôle essentiel aux KC α/β de type *coeur*. J'ai de surcroît pu montrer que les neurones MB-V2, précédemment identifiés par l'équipe (Séjourné et al. 2011), formaient la seule voie de rappel de la MLT aversive, et que les neurones MB-V3 (Plaçais et al. 2013) étaient les neurones de rappel de la MLT appétitive.

Enfin, par la même approche de blocage thermogénétique de la neurotransmission, nous avons entrepris la dissection du réseau de rappel mnésique au degré suivant, c'est à dire au niveau des neurones en aval des neurones efférents aux Corps Pédonculés. Ainsi, sachant que, parmi ces derniers, les neurones MB-V2 sont requis pour le rappel de la MLT aversive, mais également des mémoires aversives immédiate et à Moyen Terme, nous avons testé lesquels des neurones de la Corne Latérale qui leur sont post-synaptiques sont effectivement requis dans le rappel de ces différents types de mémoire. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe de Gregory Jefferis (Cambridge University, UK). De fait, j'ai pu mettre en évidence le rôle d'un nouveau groupe neuronal, le *Cluster 11*, requis pour le rappel des trois types de mémoire aversives encodées dans les KC de type α/β . L'étude de l'activité physiologique du *Cluster 11* est en cours.

En conclusion, par ces différents travaux, nous avons contribué de façon importante à la cartographie des réseaux neuronaux nécessaires au rappel des différentes phases de mémoire olfactive chez la drosophile. Ces avancées, couplées aux caractérisations anatomiques et biochimiques des neurones, permettent d'accéder à une vision globale des circuits impliqués dans les processus mnésiques, avec une résolution de l'ordre du neurone individuel, et d'en comprendre les principes de fonctionnement généraux.

Liste des abréviations

AC : Adénylate-Cyclase
Ach : Acétylcholine
AD : *activating domain*, domaine d'activation de la transcription
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMPc : AdénosineMonoPhosphate cyclique
APL : Neurone *Anterior Paired Medial*
ARN : Acide Ribonucléique
ARNi : interférence ARN
ARNm : ARN messenger
CL (ou *LH*) : Corne Latérale (ou *Lateral Horn* en anglais)
CP (ou *MB*): Corps Pédonculés (ou *Mushroom Bodies*)
CREB : *cAMP Response Element Binding-protein*
CXM : cycloheximide
DA : Dopamine
DAL : Neurone *Dorsal Anterior Lateral*
Dbd : *DNA Binding Domain*, domaine de liaison à l'ADN
DPM : neurones *Dorsal Paired Medial*
FRET : Transfert d'Énergie entre molécules Fluorescentes par Résonance
GABA : acide gamma amino butyrique
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GSO : Ganglion Sub-Oesophagien
JFRC : Janelia Farm Research Campus
KC : Cellules de Kenyon (*Kenyon Cells* en anglais)
iACT : Tractus antenno-cérébral interne
mACT : Tractus antenno-cérébral médian
MBON : *Mushroom Bodies Output Neurons*, neurones efférents aux CP
Mch/M : 4-méthylcyclohexanol
MCT : Mémoire à Court Terme
MLT : Mémoire à Long Terme
MMT : Mémoire à Moyen Terme
MRA : Mémoire Résistante à l'Anesthésie
ND (ou *DAN*) : Neurone dopaminergique (ou *DA neuron* en anglais)
NP (ou *PN*) : Neurones de projection (ou *Projection Neuron* en anglais)
LA (ou *AL*) : Lobe Antennaire (ou *Antennal Lobe* en anglais)
LT-ARM : *Long Term ARM*, ou Mémoire Résistante à l'Anesthésie à Long Terme
MT-ARM : *Middle Term ARM*, ou Mémoire Résistante à l'Anesthésie à Moyen Terme
Oct/O : 3-octanol
NOA : Neurone Octopaminergique
NRG : Neurone Récepteur Gustatif
NRO : Neurone Récepteur Gustatif
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
SC+ : Stimulus Conditionné
SC- : Stimulus non conditionné
Shi^{ts} : protéine *shibire* thermosensible
SI : Stimulus Inconditionnel
SIP : Protocerebrum Supérieur Intermédiaire
SLP : Protocerebrum Supérieur Latéral
SMP : Protocerebrum Supérieur Médian

Liste des abréviations

ST-ARM : Short *Term ARM*, ou Mémoire Résistante à l'Anesthésie à Court Terme

UAS : *Upstream Activating Sequence*, séquence d'activation de la transcription en amont

Table des matières

Introduction	23
I. La mémoire dans le monde vivant	23
I.1 Qu'est ce que la mémoire ?	23
I.1.1 Définition	23
I.1.2 Importance écologique de la mémoire	24
I.1.3 La mémoire associative : la mémoire la plus fondamentale	25
I.2 Diversité des systèmes nerveux dans le monde vivant	26
I.2.1 Différences fondamentales	27
I.2.2 Similitudes retrouvées entre les différents systèmes nerveux	28
II. La drosophile, un modèle d'étude de choix de la mémoire	32
II.1 Intérêt de la drosophile pour l'étude de la fonction cérébrale	33
II.1.1 Généralités	33
II.1.2 Un système nerveux bien décrit	33
II.1.3 Une commodité d'utilisation au laboratoire	34
II.2 Avantages techniques du modèle drosophile en neurobiologie	35
II.2.1 Contrôle spatial de l'expression génétique	35
II.2.2 Contrôle de l'activité neuronale	41
II.2.3 Imagerie in-vivo	43
III. Différentes formes de mémoire existent chez la drosophile	45
III.1 Les protocoles comportementaux de mémoire associative olfactive	46
III.2 Formes de mémoire aversive	48
III.2.1 Les différentes formes de mémoire	48
III.3 Formes de mémoire appétitive	52

Table des matières

III.3.1. Le conditionnement appétitif et les mémoires appétitives	52
IV. La mémoire olfactive dans le cerveau de la drosophile	53
IV.1 Vue globale sur l'anatomie fonctionnelle du cerveau de drosophile	53
IV.2 Le système olfactif de la drosophile.....	56
IV.2.1 Les neurones récepteurs olfactifs	56
IV.2.2 Les lobes antennaires	57
IV.2.3 Des neurones de projection aux structures secondaires du traitement olfactif : la corne latérale et les corps pédonculés.....	58
IV.3 Les Corps Pédonculés: Centre de la mémoire associative olfactive	60
IV.3.1 Description classique des Corps pédonculés.....	60
IV.3.2 Apport du système Split-Gal4 pour la caractérisation des Cellules de Kenyon	63
IV.4 Neurones extrinsèques aux corps pédonculés	65
IV.4.1 Afférences aux corps pédonculés.....	65
IV.5 Modèle intégratif	66
V. Liens dynamiques entre les différentes formes de mémoire	69
V.1.Dynamique des formes de mémoires aversives.....	69
V.1.2 Interdépendance de la MMT et de la MLT.....	69
V.1.2 La MLT et la MRA suivent deux voies parallèles et antagonistes.....	70
V.1.3 La formation de la MLT est soumise à une plasticité adaptative en période de jeûne	73
V.2 Dynamique des formes de mémoires appétitives	74
V.2.1 Effets distincts du goût sucré et de la valeur énergétique lors de la formation de la mémoire appétitive	74

Table des matières

V.2.2 Les MCT/MMT et la MLT appétitives sont indépendantes	75
V.3 Spécificités du rappel mnésique en terme de population de Cellules de Kenyon	76
V.3.1 Mémoire aversive	76
V.3.2 Mémoire appétitive	79
VI. Rôle des neurones efférents aux Corps Pédonculés dans la mémoire associative olfactive	80
VI.1 Description des efférences des Corps Pédonculés	80
VI.2 Neurones DPM et APL	81
VI.3 Spécificité du rappel au niveau des neurones efférents.....	83
VI.3.1 Mémoire aversive	83
VI.3.2 Mémoire appétitive	84
VII. Questions et objectifs	86
VII.1 Spécificités des réseaux neuronaux du rappel	87
VII.2 Dissection des réseaux neuronaux du rappel en aval des neurones efférents aux Corps Pédonculés	87
Matériel et méthodes	89
I. Elevage des drosophiles	89
II. Souches de drosophiles utilisées.....	89
III. Comportement	90
III.1 Croisement et élevage.....	90
III.2 Conditionnement aversif	90
III.2.1 Préparation des drosophiles	90
III.2.2 La phase de conditionnement	90

Table des matières

III.2.3 La phase de test	92
III.2.4 Le score de mémoire	93
III.3 Conditionnement appétitif	94
III.3.1 Préparation des drosophiles	94
III.3.2 La phase de conditionnement	94
III.4 Spécificités liées à l’outil Shibire ^{ts}	96
III.5 Contrôles.....	96
III.5.1 Test de l’olfaction.....	96
III.5.2 Evitement aux chocs électriques	96
III.5.3 Test de la réponse au sucre	97
III.6 Analyses statistiques.....	97
IV. Imagerie cérébrale <i>in vivo</i>	98
Résultats	101
I. Identification des neurones impliqués dans le rappel des mémoires à long terme aversive et appétitive	101
I.1 Identification systématique par approche Split-Gal4.....	102
I.1.1 La banque de lignées Split-Gal4 construites à Janelia Farm Research Campus couvre la quasi-totalité des Cellules de Kenyon et des neurones extrinsèques aux Corps Pédonculés	102
I.1.2 Stratégie employée pour l’identification systématique des neurones du rappel des MLT	108
I.1.3 Identification systématique des neurones requis dans le rappel de la MLT aversive.....	110
I.1.4 Identification systématique des neurones requis dans le rappel de la MLT appétitive	123

Table des matières

I.2. Etude de l'implication des neurones Output $\beta_2\beta'2a$ dans le rappel de la MLT appétitive	138
I.3. Etude de l'implication des neurones DPM et APL dans le rappel des Mémoires à Long Terme aversive et appétitive	142
I.3.1 Les neurones DPM sont requis pour le rappel de la MLT aversive.....	142
I.3.2 Implication des neurones APL pour le rappel de la MLT appétitive.....	146
II. Etude des neurones en aval des MB-V2 nécessaires au rappel des mémoires aversives	148
II.1 Intérêt scientifique de la description du réseau neuronal en aval du centre de la mémoire.....	148
II.2 Stratégie	150
II.3 Les neurones du <i>Cluster 11</i> sont requis pour le rappel de différentes formes de mémoire aversive.....	153
II.3.1 Etude du rôle des différents clusters dans le rappel de la Mémoire à Moyen Terme	153
II. 3.2 Rôle dans le rappel de la MLT.....	157
II. 3.3 Rôle dans le rappel de la ST-ARM.....	158
I.4 Recherche d'une modification de l'activité des neurones du <i>Cluster 11</i> <i>dépendante de l'apprentissage</i>	159
III. Etude des neurones dopaminergiques oscillants MV1/MP1 en contexte mutant pour le gène <i>radish</i>	160
Discussion.....	165
I. Circuits du rappel des mémoires à long terme aversive et appétitive	165
I.1 Avancées sur la caractérisation des réseaux neuronaux du rappel de la MLT aversive.....	165
I.1.1 L'implication des Cellules de Kenyon α/β est acquise.....	165

Table des matières

I.1.2 L'ensemble des MB-V2 participe au rappel de la MLT aversive.....	167
I.1.3 Débats sur la participation des neurones MB-V3 et MB-V4 au rappel de la MLT aversive	169
I.1.4 Les DPM sont requis lors du rappel, mais quid du mécanisme en jeu?.	171
I.2 Avancées sur la caractérisation des réseaux neuronaux du rappel de la MLT appétitive	171
I.2.1 Vers une caractérisation affinée des Cellules de Kenyon α/β requises lors du rappel de la MLT appétitive	172
I.2.2 Les MB-V3 sont définitivement requis pour le rappel de la MLT appétitive	174
I.2.3 Incertitude quant à l'implication des neurones Outputs $\beta 2\beta' 2a$ dans le rappel de la MLT appétitive	175
I.3 Comparaison des réseaux du rappel des MLT aversive et appétitive	176
II. Discussion critique sur l'approche systématique et exhaustive employée.	177
II.1 Les objectifs de caractérisation exhaustive des réseaux neuronaux du rappel des MLT sont-ils atteints ?	177
II.2 Evaluation critique de l'approche Split-Gal4 systématique	178
III. Ouvertures relatives à nos travaux	180
III.1 Zones de projections des neurones efférents	183
III.2 Projections sur la Corne Latérale	184
III.3 Projections sur le SMP	185
III.4 Combinaisons d'effets comportementaux	185
III.5 Existence de différents étages de neurones efférents	186
IV. Identification de neurones en aval des MB-V2 nécessaires au rappel des mémoires aversives	187

Table des matières

IV.1 Le <i>Cluster 11</i> serait nécessaire au rappel de tous les types de mémoire requérant les MB-V2.....	187
IV.2 Mise en œuvre de l'étude physiologique de ces neurones	190
IV.3 Intégration dans le schéma canonique de réseau neuronal.....	191
Conclusion générale	193

Index des figures

Figure 1 : Le conditionnement classique ou pavlovien.....	25
Figure 2 : Les systèmes nerveux peuvent présenter des aspects très divers	27
Figure 3 : Morphologie des neurones.....	28
Figure 4 : Exemple de conservation des voies de biosynthèse des neurotransmetteurs : la dopamine	29
Figure 5 : Neurulation chez les insectes et les vertébrés.....	31
Figure 6 : Comparaison des patrons d'expression de quelques gènes architectes homologues entre la drosophile et la souris.....	32
Figure 7 : Vue d'ensemble du cerveau de drosophile.....	34
Figure 8 : Le système UAS/Gal4 permet une expression génétique à résolution spatiale.....	37
Figure 9 : Le système Split-Gal4.....	38
Figure 10 : Mécanismes de l'interférence par ARN	40
Figure 11 : La résolution spatio-temporelle du système TARGET permet d'éviter les défauts développementaux.....	41
Figure 12 : Shibire ^{ts} permet l'inhibition de la transmission synaptique	42
Figure 13 : Principe de la sonde calcique GCaMP.....	44
Figure 14 : Principe de la sonde AKAR.....	45
Figure 15 : Schéma du paradigme olfactif appétitif.....	47
Figure 16 : Test de rappel mnésique	47
Figure 17 : Schéma du paradigme olfactif aversif	47
Figure 18 : Mémoires labiles.....	49
Figure 19 : La Mémoire Résistante à l'Anesthésie ne requiert pas de néo-synthèse protéique	50
Figure 20 : La MLT est formée après un conditionnement espacé et dépend de la synthèse protéique <i>de novo</i>	51

Index des figures

Figure 21 : Courbes de rétention mnésique relatives aux différentes formes de mémoire	51
Figure 22 : La MLT appétitive est formée dès un cycle de conditionnement.....	52
Figure 23 : Le cerveau de drosophile au sein de sa capsule céphalique	53
Figure 24 : Représentation schématique du neuropile	54
Figure 25 : Les récepteurs olfactifs d'insectes fonctionnent différemment de ceux des mammifères.....	57
Figure 26 : Circuits neuronaux du traitement de l'information olfactive	58
Figure 27 : Visualisation des neurones de projection et des régions innervées.....	59
Figure 28 : Variation des Corps Pédonculés chez les insectes.....	61
Figure 29 : Représentation schématique des Corps Pédonculés et de leurs afférences olfactives	62
Figure 30 : Description améliorée des Cellules de Kenyon.....	64
Figure 31 : Afférences dopaminergiques aux Corps Pédonculés.....	66
Figure 32 : Détection de coïncidence des stimuli conditionné et inconditionné.....	68
Figure 33 : Ancien modèle du lien entre les formes de mémoire aversive	69
Figure 34 : MMT et MRA n'ont pas les mêmes exigences moléculaires.....	70
Figure 35 : Modèle des formes de mémoire parallèles	71
Figure 36 : Exclusivité et antagonisme de la MLT et de la MRA	72
Figure 37 : Mécanisme proposé de l'antagonisme MLT-MRA.....	73
Figure 38 : La disponibilité énergétique dicte la formation de la MLT via les neurones dopaminergiques	74
Figure 39 : Les neurones dopaminergiques MP1 contrôlent la formation de MLT appétitive	75
Figure 40 : Implication des populations de KC pour le rappel des mémoires immédiates et à 3 heures	77

Index des figures

Figure 41 : MLT et LT-ARM ne dépendent pas des mêmes efférences des KC lors du rappel mnésique.....	78
Figure 42 : Cellules de Kenyon requises lors du rappel des mémoires appétitives	79
Figure 43 : Les neurones efférents couvrent les Corps Pédonculés.....	80
Figure 44 : Description anatomique des neurones efférents aux CP.....	81
Figure 45 : Modélisation 3D des neurones APL et DPM au sein du cerveau de drosophile ...	82
Figure 46 : Anatomie des neurones MB-V2	83
Figure 47 : Neurones efférents et Cellules de Kenyon requis pour le rappel des différentes formes de mémoire aversive (Bouzaiane et al., 2015)	84
Figure 48 : Localisation des neurones MB-V3	85
Figure 49 : Les neurones MB-V3 sont requis spécifiquement pour le rappel de la MLT appétitive	85
Figure 50 : Le blocage des neurones MB-M6 affecte le rappel de la mémoire appétitive à 3 heures	86
Figure 51 : Dispositif utilisé pour le conditionnement aversif.....	91
Figure 52 : Représentation d'un cycle de conditionnement aversif.....	92
Figure 53 : Dispositif de test	93
Figure 54 : Dispositif de conditionnement appétitif.....	95
Figure 55 : Préparation des drosophiles pour l'imagerie	99
Figure 56 : Patrons d'expression neuronale des lignées de la banque Split-Gal4 de JFRC...	104
Figure 57 : Présentation des sous-types de Cellules de Kenyon γ et α'/β'	104
Figure 58 : Présentation des sous-types de Cellules de Kenyon α/β	105
Figure 59 : Présentation des neurones efférents glutamatergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments	106

Index des figures

Figure 60 : Présentation des neurones efférents GABAergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments	107
Figure 61 : Présentation des neurones efférents cholinergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments	107
Figure 62 : Vue d'ensemble du criblage initial pour la MLT aversive.....	111
Figure 63 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les Cellules de Kenyon.....	113
Figure 64 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les neurones efférents aux CP	114
Figure 65 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les neurones afférents aux CP	115
Figure 66 : Les Cellules de Kenyon α/β sont impliquées lors du rappel de la MLT aversive	116
Figure 67 : Deux lignées Split-Gal4 marquant une sous-partie des KC α/β n'ont pas présenté de défaut	117
Figure 68 : Les MB-V2 sont impliqués dans le rappel de la MLT aversive	118
Figure 69 : Le blocage des MB-V2 α seuls ne semble pas suffire à induire un défaut de MLT aversive.....	119
Figure 70 : Le cluster MB-V3/MB-V4 est l'objet de discordances dans le cadre du rappel de la MLT aversive	120
Figure 71 : Expériences complémentaires relatives à l'implication de cluster MB-V3/MB-V4 dans le rappel de la MLT aversive	121
Figure 72 : Les DAL ne sont pas impliqués dans le rappel de la MLT aversive	122
Figure 73 : Vue d'ensemble du criblage initial pour le rappel de la MLT appétitive.....	124
Figure 74 : Résultat de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les Cellules de Kenyon.....	126

Index des figures

Figure 75 : Résultat de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les neurones efférents	128
Figure 76 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les neurones afférents	129
Figure 77 : Bilan de l'étape de confirmation des candidats pour le rappel de la MLT appétitive	131
Figure 78 : Les Cellules de Kenyon α/β sont également impliquées dans le rappel de la MLT appétitive	132
Figure 79 : Les Cellules de Kenyon α/β <i>coeur</i> sont requises lors du rappel de la MLT appétitive	133
Figure 80 : Les neurones MB-V3 sont requis pour le rappel de la MLT appétitive	134
Figure 81 : Les neurones <i>Output</i> $\beta 2\beta'2a$ sont requis pour le rappel de la MLT appétitive ...	135
Figure 82 : Lignées n'ayant pas passé avec succès les contrôles de l'étape de confirmation.	137
Figure 83 : Deux lignées pour les neurones <i>Output</i> $\beta 2\beta'2a$ ne présentent pas de défaut en test à température restrictive	139
Figure 84 : La lignée MB074C semble présenter un défaut spécifique de MLT appétitive ..	140
Figure 85 : L'implication des neurones <i>Output</i> $\beta 2\beta'2a$ pour le rappel de la MMT appétitive n'est pas certaine	141
Figure 86 : Les neurones DPM sont requis spécifiquement dans le rappel de la MLT aversive	143
Figure 87 : Etude de la physiologie des neurones DPM en imagerie calcique	145
Figure 88 : Les neurones APL ne sont pas impliqués dans le rappel de la MLT aversive	147
Figure 89 : Etude de l'implication des neurones APL dans le rappel de la MLT appétitive..	148
Figure 90 : Les neurones MB-V2 établissent un lien entre les Corps Pédonculés et la Corne Latérale	149

Index des figures

Figure 91 : Caractérisation anatomique des neurones partenaires putatifs des MB-V2 au sein de la Corne Latérale	151
Figure 92 : Résumé des types neuronaux impliqués dans le projet	152
Figure 93 : Ni les neurones du <i>Cluster 7</i> ni ceux du <i>Cluster</i> candidat du SIP ne sont nécessaires dans le rappel de la MMT aversive	154
Figure 94 : La lignée 37G11 propose un rôle du <i>Cluster 11</i> dans le rappel de la MMT aversive	155
Figure 95 : Recherche d'autres lignées confirmant le phénotype de 37G11	156
Figure 96 : Lignées supplémentaires marquant le <i>Cluster 11</i>	157
Figure 97 : Le <i>Cluster 11</i> serait impliqué également dans le rappel de la MLT aversive	158
Figure 98 : Les neurones du <i>Cluster 11</i> seraient également impliqués dans le rappel de la ST-ARM.....	159
Figure 99 : Les neurones du <i>Cluster 11</i> répondent à la présentation de molécules odorantes	160
Figure 100 : L'effet des neurones dopaminergiques MV1/MP1 sur le contrôle de la MRA est indépendant de <i>radish</i>	162
Figure 101 : Les oscillations spontanées des neurones dopaminergiques MV1/MP1 ne sont pas affectées par la mutation <i>radish</i>	163
Figure 102 : Les Cellules de Kenyon α/β <i>surface</i> et <i>postérieur</i> sont requises ensemble	166
Figure 103 : Bilan du blocage des combinaisons de KC pendant le rappel de la MLT aversive	167
Figure 104 : L'activation des MB-V2 par CsChrimson génère une attraction seulement quand tous les MB-V2 sont manipulés	168
Figure 105 : Les neurones MB-V3 ne sont pas requis dans le rappel de la MLT aversive ...	170
Figure 106 : Bilan du blocage des combinaisons de KC pendant le rappel de la MLT appétitive	172

Index des figures

Figure 107 : Dissection des Cellules de Kenyon requises pour le rappel de la MLT appétitive	173
Figure 108 : Les neurones MB-V3 renferment une trace mnésique spécifique de la MLT appétitive	175
Figure 109 : Vision schématique des circuits du rappel des MLT aversive et appétitive.....	176
Figure 110 : La lignée MB370B ne présente pas de défaut de réponse au sucre.....	179
Figure 111 : Bilan des types neuronaux identifiés pour les différents comportements testés dans la collaboration JFRC	181
Figure 112 : Description des zones de projection des neurones efférents aux Corps Pédonculés	183
Figure 113 : Effets additifs de l'activité des neurones efférents aux Corps Pédonculés	186
Figure 114 : Caractérisation anatomique des projections axonales des neurones efférents aux CP	189

Introduction

Ma thèse a porté sur l'étude des mécanismes de la mémoire chez la drosophile. Les recherches dans ce domaine trouvent au moins deux justifications essentielles. Tout d'abord, la science répond à un impératif de connaissance pure, fondamentale, et mon travail s'inscrit plus particulièrement dans ce cadre. Et, en second plan, les avancées réalisées sur le modèle drosophile peuvent, à plus ou moins long terme, avoir des retombées dans la recherche biomédicale, dans une perspective d'amélioration de la santé humaine.

Dans cette seconde perspective, les recherches sur la mémoire de la drosophile s'inscrivent dans le cadre plus global de l'étude des fonctions cognitives et de leurs dysfonctionnements. Je vais donc procéder à quelques rappels de neurosciences cognitives, en précisant des concepts qui sont aussi bien utiles à la compréhension de l'homme et de son cerveau qu'à celui de la drosophile, au niveau où se situent nos études. Ensuite, après avoir montré l'intérêt que peut présenter le système nerveux d'un organisme tel que la drosophile, nous effectuerons une plongée au cœur de cet organisme modèle, en décrivant la constitution de son cerveau, ainsi que les outils disponibles pour son étude, afin de pouvoir appréhender correctement les problématiques de ma thèse.

I. La mémoire dans le monde vivant

La mémoire telle qu'elle se manifeste chez l'être humain est l'un des phénomènes les plus fascinants que l'on puisse expérimenter. Pour mieux cerner les problématiques qui nous occupent jusque dans le champ de la mémoire de la drosophile, nous allons en rappeler quelques propriétés fondamentales. Nous aborderons ensuite le rôle que joue le système nerveux dans la manifestation des capacités mnésiques et, sous l'angle de l'évolution, nous envisagerons les différences mais aussi les points communs entre les systèmes nerveux des différentes espèces animales.

I.1 Qu'est ce que la mémoire ?

I.1.1 Définition

En biologie, on appelle mémoire les processus permettant d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations. Au sens psychologique du terme, c'est une faculté mentale reposant sur le système nerveux, permettant de se souvenir d'expériences passées.

Chez l'être humain, la mémoire revêt différentes facettes. On distingue généralement les mémoires déclaratives et les non-déclaratives (Squire, 1987). La mémoire sémantique et la mémoire épisodique, qui sont deux systèmes de représentation consciente à long terme, constituent la mémoire déclarative. La mémoire sémantique relève de savoirs et de connaissances globales sur soi et sur le monde (Binder and Desai, 2011), tandis que la mémoire épisodique s'intéresse aux moments et événements passés (Ferbinteanu et al., 2006). Néanmoins, les événements de la mémoire épisodiques tendent à s'amalgamer pour former un corpus sémantique.

Parmi les mémoires non-déclaratives, on trouve la mémoire procédurale permettant des automatismes kinétiques inconscients, pour développer des aptitudes comme la marche, le jeu d'un instrument de musique, ou encore des capacités artistiques comme le dessin (Gasbarri et al., 2014). Ces apprentissages sont inconscients. Les peurs apprises ou les aversions, impliquant l'amygdale sont également des formes de mémoire non-déclarative (Herry and Johansen, 2014).

Ensuite, il est possible d'effectuer une catégorisation de la mémoire selon son déroulement temporel. Les mémoires dites à long terme peuvent durer des jours, des mois ou des années, tandis que des mémoires à court terme, qui vont s'effacer plus rapidement. A l'extrême, la mémoire de travail est une mémoire à très court terme, qui permet de stocker des informations pendant quelques secondes ou dizaines de secondes, et nécessite d'être remobilisée régulièrement pour durer un peu plus longtemps (Baddeley, 2003; Goldman-Rakic, 1992).

La subjectivité de cette catégorisation, liée en particulier au langage humain, rend difficile son extrapolation aux autres espèces animales. Néanmoins, on peut raisonnablement exclure que le nématode dispose d'une mémoire sémantique, et l'on peut envisager une gradation dans l'acquisition de ces catégories mnésiques avec la complexité du système nerveux des espèces animales.

1.1.2 Importance écologique de la mémoire

L'adaptation à un environnement fluctuant peut passer par la sélection naturelle quand il s'agit de fluctuations sur des échelles de temps larges et conduire à des adaptations morphologiques et physiologiques sur plusieurs générations. Mais les organismes doivent pouvoir s'adapter à des variations bien plus rapides. Dans ce cas, le meilleur atout pour la

survie est de pouvoir adapter son comportement à la situation, qu'elle soit nouvelle ou déjà expérimentée.

L'adaptation comportementale implique acquisition, traitement, stockage de l'information, rappel, comparaison et prise de décision, voire invention. Cela permet de tenir compte des expériences antérieures afin d'éviter de reproduire des erreurs, de perfectionner son comportement, voire de créer une nouvelle réponse comportementale (qui sera ensuite elle-même évaluée) (Bear, Connors et Paradiso).

Les apprentissages simples consistent à modifier la réponse de l'organisme à un stimulus élémentaire, ce qui nécessite généralement des présentations répétées du stimulus. On distingue les apprentissages non-associatifs comme l'habituation, la sensibilisation et l'empreinte, lorsque l'individu est exposé à un seul stimulus de façon singulière (Rahn et al., 2013) ou répétée et les apprentissages associatifs où plusieurs stimuli sont utilisés simultanément (Wasserman and Miller, 1997).

1.1.3 La mémoire associative : la mémoire la plus fondamentale

L'apprentissage associatif forme des associations entre des événements, l'un devenant prédictif de l'autre. On distingue le conditionnement classique, dit « pavlovien », du conditionnement opérant, ou skinnerien.

Dans le conditionnement classique, adopté par Ivan Pavlov en 1928, l'animal subit les stimuli (Figure 1). Un stimulus initialement neutre (SN) est présenté de façon contigüe à un stimulus inconditionnel (SI) générant indépendamment de tout apprentissage une réponse systématique. Au fil des présentations, le SN devient conditionné (SC), c'est à dire qu'il induit la réponse initialement associée au SI. L'ordre de présentation des stimuli a une importance particulière : le SC doit précéder le SI, ou du moins démarrer avant lui.



Figure 1 : Le conditionnement classique ou pavlovien

Le son d'une cloche est initialement neutre, tandis que la présentation de viande induit systématiquement la salivation (A). En répétant la présentation simultanée des deux stimuli (B), le son de cloche acquiert la valence du stimulus inconditionné : il devient un stimulus conditionné à même de produire directement la salivation (C) (adapté de Neuroscience, Bear, Connors et Paradiso)

Avec le conditionnement opérant, l'animal est acteur (Zentall, 2002). Il est généralement basé sur un comportement nouveau que le sujet doit découvrir de lui-même. Cela requiert donc plus d'activité volontaire que dans le conditionnement classique. Le comportement initialement neutre pourra être produit par hasard et être récompensé (ou permettre d'éviter une punition). Le comportement récompensé va pouvoir alors être reproduit et renforcé. L'individu apprend donc les conséquences que peut avoir le fait de se conduire de telle ou telle manière.

Ces formes d'apprentissages sont très rudimentaires et sont retrouvées jusque chez les espèces les moins complexes. Par exemple, il est possible de procéder au conditionnement classique chez l'Aplysie en couplant un stimulus neutre, la stimulation du siphon, à un stimulus inconditionnel, la stimulation de la queue induisant le réflexe de rétraction des branchies. La stimulation du siphon acquiert alors la capacité à déclencher la réponse réflexe de rétraction des branchies, et cela seulement si le SC précède le SI. Les travaux d'Eric Kandel ont visé à comprendre comment et où est formée cette mémoire, et ont été récompensés par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine 2000. Chez la drosophile également il est possible de procéder à des conditionnements classiques (comme l'association odeur-punition que nous utilisons dans notre laboratoire(Quinn et al., 1974)) et opérants (Brembs, 2008).

1.2 Diversité des systèmes nerveux dans le monde vivant

Chez la plupart des espèces animales, le système nerveux sert de base pour soutenir ces processus mnésiques. Nous ne reviendrons pas sur les principes généraux de fonctionnement du système nerveux. Cependant, nous allons reprendre quelques différences et points communs que l'on retrouve entre les différents systèmes nerveux, afin d'être mieux armé pour comparer la drosophile à d'autres espèces comme les mammifères.

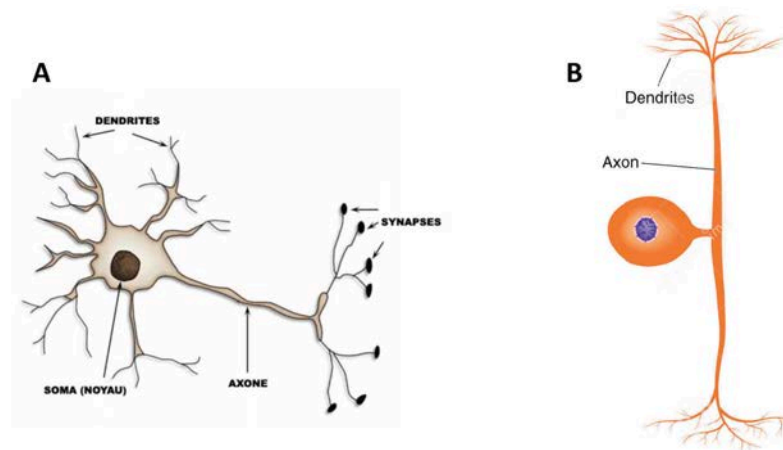


Figure 3 : Morphologie des neurones

(A) *Un neurone bipolaire : le compartiment dendritique est en amont du corps cellulaire et le compartiment axonal en aval (biotechnozen.com)*

(B) *Un neurone unipolaire : les dendrites et l'axone sont en continuité, en dérivation du corps cellulaire (dreamstime.com)*

Ces neurones s'organisent en ganglions dans le système nerveux des insectes, alors que les vertébrés présentent une complexité accrue. Chez ces derniers, les hémisphères cérébraux d'origine prosencéphalique comportent une structure particulière, le cortex cérébral qui lui-même présente une diversité particulière à travers les espèces. Chez les reptiles comme l'alligator, le cortex est constitué d'une unique couche de neurones, tandis qu'on peut distinguer jusqu'à six couches chez les mammifères comme le rat ou l'homme (Figure 2).

Sans chercher à être exhaustif, il nous faut noter que de nombreuses autres différences existent entre espèces animales à des niveaux différents dans la physiologie du système nerveux. Par exemple, la propagation de signaux électriques ne se fait pas sous la forme de potentiels d'action chez le ver nématode, et chez les insectes, et en particulier la drosophile, les fibres axonales ne sont pas myélinisées.

1.2.2 Similitudes retrouvées entre les différents systèmes nerveux

Au delà des différences manifestes, de nombreuses caractéristiques permettent de rassembler les différents systèmes nerveux retrouvés au sein du règne animal.

I.2.2.1 Des propriétés communes

A l'échelle des neurones, les propriétés électriques et synaptiques sont globalement conservées. On retrouve aussi bien des neurones excitateurs que des neurones inhibiteurs chez les différentes espèces.

De façon reliée, la plupart des neurotransmetteurs utilisés dans le système nerveux sont partagés : acétylcholine, glutamate, dopamine, sérotonine, GABA, ainsi que différents neuropeptides (Hen, 1993; Lazarus et al., 1985; Vernier et al., 1993). Toutes ces homologues sont issues de l'existence de gènes orthologues entre les différentes espèces. En l'occurrence, la conservation des neurotransmetteurs provient d'une forte conservation dans les enzymes de biosynthèse de ces neurotransmetteurs (Figure 4) (Smidt and Burbach, 2009).

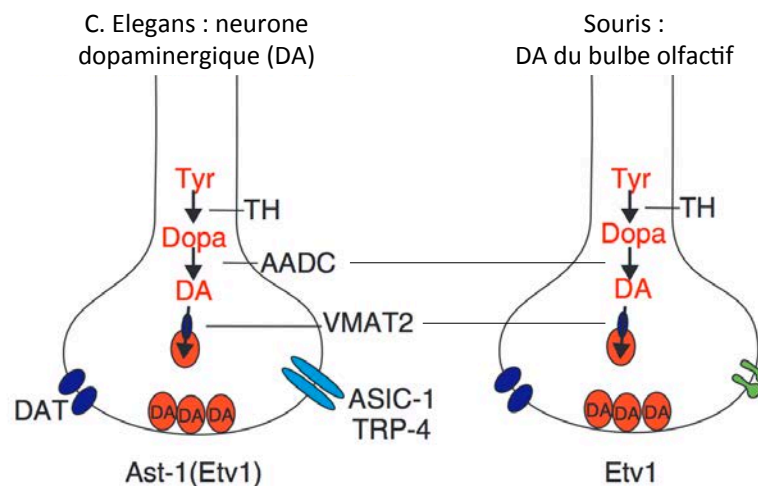


Figure 4 : Exemple de conservation des voies de biosynthèse des neurotransmetteurs : la dopamine

*Chez le nématode *C. elegans* ou chez la souris *Mus musculus*, on retrouve des neurones dopaminergiques, dépendant de la voie de biosynthèse de la dopamine qui dépend d'enzymes clés telles que TH (tyrosine hydroxylase), AADC (Amino-acid decarboxylase), VMAT2 (Vesicular Monoamine transporter), DAT (Dopamine transporter). Chacun des gènes codant ces enzymes est directement régulé par un facteur de transcription essentiel Ast-1 et Etv1, orthologues l'un de l'autre (Smidt and Burbach, 2009).*

La plasticité synaptique, mécanisme fondamental permettant le stockage d'information, est également très conservé. Nous pouvons également noter que les messagers rétrogrades au niveau de la synapse existent chez la plupart des espèces : la drosophile par exemple présente une communication rétrograde dépendant du NO (Wildemann and Bicker, 1999).

En outre, il peut également exister des connexions non synaptiques entre les neurones, via des jonctions communicantes, à même de former des synapses électriques, y compris chez la drosophile (Wu et al., 2011).

Une autre caractéristique très partagée des systèmes nerveux centraux dans de nombreuses espèces, y compris la Drosophile, est la présence de cellules gliales, en proportion plus ou moins importante par rapport aux neurones (Freeman and Doherty, 2006). Si les cellules gliales, et en particulier les astrocytes, sont majoritaires chez les mammifères, les cellules gliales (astrocytes, glie corticale et glie « gainante ») restent minoritaires chez la drosophile. Toutefois, ces cellules gliales semblent à même d'exercer des fonctions équivalentes à celles des astrocytes chez les mammifères, c'est à dire d'entourer les corps cellulaires et les neurites proximales, d'être couplées au réseau vasculaire et d'être étroitement associées aux synapses (Freeman, 2015; Muthukumar et al., 2014; Stork et al., 2014).

Enfin, on peut également remarquer que de nombreuses voies de transduction du signal sont conservées et que l'on retrouve chez les différentes espèces aussi bien les récepteurs métabotropiques que les récepteurs ionotropiques (Dupuis et al., 2012; Hannan and Hall, 1993).

1.2.2.2 Une organisation comparable

A l'échelle de l'organisation des réseaux de neurones, on peut encore relever certaines similitudes. Evidemment, par la nécessité de sonder l'environnement et de réagir, les neurones sensoriels contactent un étage intermédiaire qui lui-même contacte, en aval, les neurones moteurs. Une telle organisation se retrouve tant dans l'arc réflexe des mammifères permettant l'ajustement de la posture que dans les réponses innées aux odeurs aversives chez la drosophile. Et chez les différents organismes, une réponse innée peut être modulée par l'apprentissage, en impliquant une dérivation de l'information vers des centres intégrateurs (Heisenberg et al., 1985; Mast et al., 2014).

D'autres ensembles de neurones tels que ceux de l'horloge circadienne présentent également une certaine homogénéité entre espèces. Ainsi les horloges centrales sont composées de multiples oscillateurs, utilisent des neuropeptides et leur structure présente plus ou moins clairement un noyau recevant des afférences rétiniennes et une région dédiée aux

efférences. En outre, des connexions réciproques adéquates permettent par la synchronisation gauche-droite une rythmicité normale (Helfrich-Förster, 2004).

1.2.2.3 Une origine développementale partagée

L'existence des différences et des similitudes que nous venons d'évoquer provient du fait que les systèmes nerveux retrouvés des invertébrés aux vertébrés sont le fruit de l'évolution. Dans ce cadre, les changements successifs ont permis une meilleure adaptation à un environnement toujours fluctuant, et se sont traduits par une complexification plus ou moins importante selon les branches, associée à des capacités cognitives plus ou moins accrues.

D'autres vestiges de l'origine évolutive commune des systèmes nerveux se retrouve au niveau du développement embryonnaire. Chez les drosophiles comme chez les mammifères, après la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde, les premières divisions cellulaires vont conduire aux stades blastula, gastrula puis neurula de l'embryon. Cependant, il convient de noter que chez les insectes, les premières mitoses conduisent à la formation d'un *syncytium*, qui va par la suite se cellulariser pour poursuivre le développement embryonnaire (Langley et al., 2014). Lors de la neurulation apparaît la première structure différenciée à l'origine du système nerveux, la plaque neurale : à ce stade, l'embryon est encore similaire.

Ensuite, chez les vertébrés, la plaque neurale va se replier pour former un tube neural, à partir duquel se formeront des vésicules dans sa partie antérieure qui deviendront le cerveau (Smith and Schoenwolf, 1997) (Figure 5). En revanche, chez les invertébrés comme les insectes ou les mollusques la plaque neurale ne va pas se refermer, et donnera lieu à des ganglions (ou amas de cellules nerveuses) dérivant de cellules précurseurs indépendantes issues de différentes régions de la plaque neurale (Arendt and Nubler-Jung, 1999) (Figure 5).

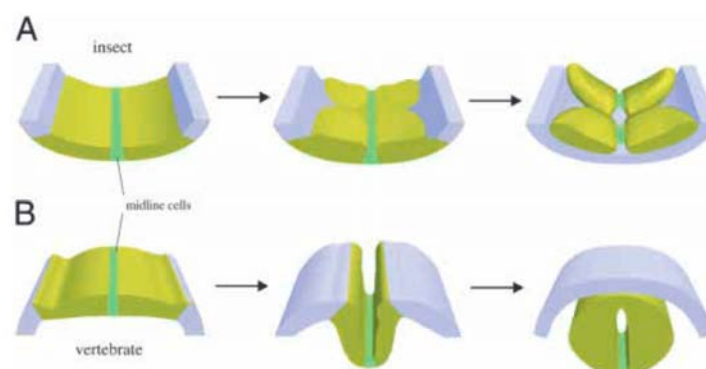


Figure 5 : Neurulation chez les insectes et les vertébrés

Chez les insectes (A), la neurulation conduit à la genèse d'une chaîne nerveuse ventrale, tandis que chez les vertébrés (B), il y a construction d'un tube neural en position dorsale. Les flèches indiquent les séquences d'ontogenèse. En jaune-vert, ectoderme neurogénique ; en bleu, ectoderme épidermique (Arendt and Nubler-Jung, 1999).

Enfin, il est frappant de remarquer que les gènes architectes du développement initial du système nerveux présentent de fortes homologies en terme de séquence ADN mais également en terme de patron spatio-temporel d'expression (Arendt and Nubler-Jung, 1999) (Figure 6).

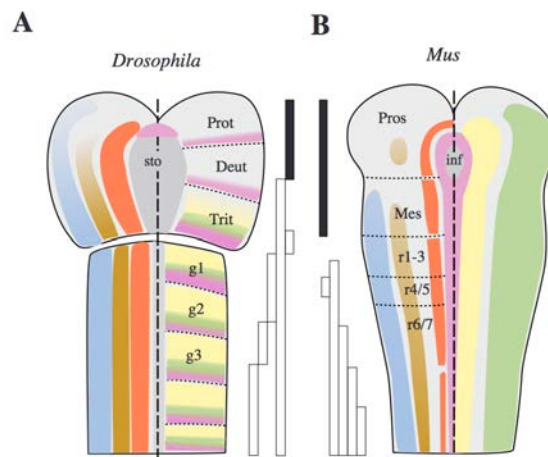


Figure 6 : Comparaison des patrons d'expression de quelques gènes architectes homologues entre la drosophile et la souris

Expression de msh/Msx (bleu), ind/Gsh-1 (marron) NK-2/NK-2.2- (rouge), hedgehog/Shh (violet), gooseberry/Pax-3/7 (vert), patched (jaune), orthodenticle/Otx (barres noires) and Hox homologues (barres blanches) dans le neuroectoderme de (A) la drosophile au stade de la délamination des neuroblastes et (B) la souris à environ neuf jours après conception (avec tube neural déplié en plaque neurale pour une meilleure comparaison (Arendt and Nubler-Jung, 1999).

II. La drosophile, un modèle d'étude de choix de la mémoire

Ces notions de physiologie et de développement nous ayant rappelé la conservation dans la constitution des systèmes nerveux au sein du règne animal, l'étude du système nerveux d'un invertébré comme la drosophile dans une perspective de compréhension du cerveau humain apparaît donc légitime sur le plan fondamental. Nous allons maintenant aborder les différentes raisons pratiques qui en ont fait l'organisme modèle privilégié qu'est actuellement la drosophile.

II.1 Intérêt de la drosophile pour l'étude de la fonction cérébrale

II.1.1 Généralités

La drosophile a été introduite comme modèle animal au début du XX^{ème} siècle. Les études sur la drosophile ont permis des découvertes majeures en génétique. Au-delà de ce champ disciplinaire, c'est maintenant un des organismes les plus intensivement étudiés en biologie. Ainsi la drosophile sert de système modèle pour l'étude de nombreux processus cellulaires, développementaux et physiologiques communs aux eucaryotes supérieurs, y compris l'Homme.

Le génome de la drosophile contient quatre paires de chromosomes : une paire de chromosomes sexuels, et trois autosomes, les chromosomes 2, 3 et 4. Suite au séquençage de son génome (Adams et al., 2000), le nombre de gènes codant des protéines a été estimé à environ 14.000 à comparer aux 22.500 que compte le génome humain. De plus, de nombreux mécanismes moléculaires présentent un fort degré de conservation évolutive. Ainsi, plus de 60 % des gènes humains ont un orthologue fonctionnel chez la drosophile (Rubin, 2000). En particulier, la plupart des orthologues impliqués dans des processus développementaux, des processus métaboliques ou dans l'organogenèse présentent un fort degré de conservation.

Les drosophiles sont capables de manifester une grande variété de comportements complexes issus de processus physiologiques proches de ceux observés chez les vertébrés (Pitman et al., 2009). De manière non exhaustive, la drosophile a été utilisée dans des études portant sur les rythmes circadiens (Peschel and Helfrich-Förster, 2011), le sommeil (Bushey and Cirelli, 2011), l'apprentissage et la mémoire (Quinn et al., 1974), la parade nuptiale (Siegel and Hall, 1979; Tompkins et al., 1983), l'alimentation (Amrein and Thorne, 2005), l'agressivité (Dahanukar and Ray, 2011) ou la navigation en vol (Weir and Dickinson, 2012).

II.1.2 Un système nerveux bien décrit

La drosophile présente l'avantage de posséder un système nerveux relativement simple mais hautement structuré. Le cerveau de la drosophile fonctionne sur les mêmes principes généraux que celui des mammifères et est composé d'environ 100.000 neurones (Ito et al., 1997; Tanaka et al., 2008) ainsi que différents types de cellules gliales au fonctionnement similaire aux mammifères (Freeman and Doherty, 2006). Cependant, contrairement aux vertébrés, les neurones sont plus nombreux que les cellules gliales dans le cerveau de la drosophile (Awasaki and Lee, 2011). Les cellules gliales de la drosophile ne

produisent pas de myéline, mais ont la capacité d'étendre leur membrane et d'envelopper les axones des neurones (Banerjee and Bhat, 2008). Les corps cellulaires des neurones sont regroupés à la périphérie du cerveau, alors que les projections axonales et dendritiques se regroupent au centre formant le neuropile. Malgré sa petite taille, le cerveau de la drosophile comprend différentes structures bien caractérisées (Figure 7), et de nombreux circuits neuronaux ont été cartographiés en détail (Ito et al., 1997; Stocker, 1994; Strauss and Heisenberg, 1993; Tanaka et al., 2008).

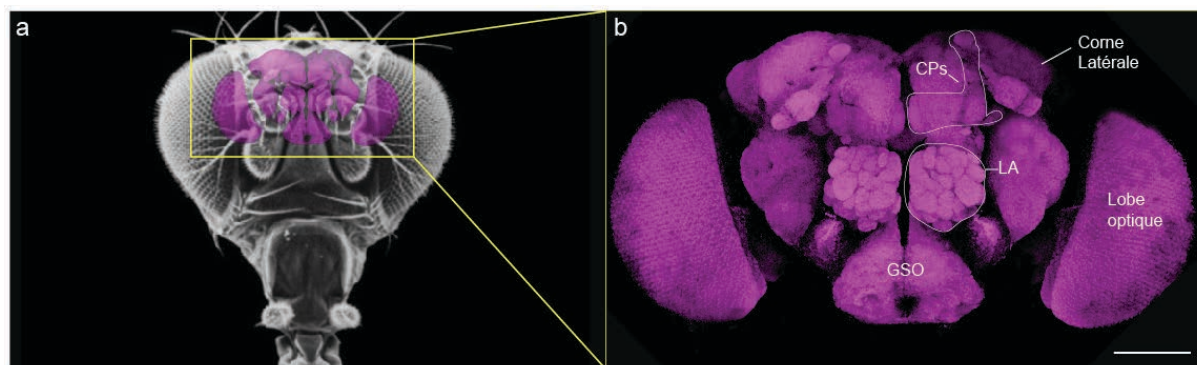


Figure 7 : Vue d'ensemble du cerveau de drosophile

A) Cliché de microscopie électronique d'une tête de Drosophile avec son cerveau en surimpression. B) Vue à plus grande échelle d'un cerveau, obtenue par un marquage immunohistochimique utilisant un anticorps anti-nc82. Ce marquage révèle les structures du neuropile. Ce schéma met en évidence les structures relayant les principales modalités sensorielles : les lobes optiques pour la vision, les lobes antennaires pour l'odorat et le ganglion sub-oesophagien (GSO) pour le goût. Les corps pédonculés (CP) et la corne latérale (CL), structures de second ordre du traitement de l'information olfactive, sont aussi illustrés. Les CP sont un important centre intégrateur des différentes modalités, et jouent un rôle fondamental dans les processus de mémoire.

II.1.3 Une commodité d'utilisation au laboratoire

L'utilisation de la drosophile comme organisme modèle découle notamment d'aspects pratiques majeurs. En premier lieu, son élevage est simple, dans des bouteilles ou tubes de milieu nutritif placés dans des incubateurs aux conditions finement contrôlées (température, humidité, cycle jour/nuit). D'autre part, son cycle de reproduction est particulièrement court : 10 jours à 25°C. Cela offre donc au laboratoire la possibilité d'obtenir un grand nombre d'individus rapidement et à moindre coût. La drosophile offre également la possibilité d'effectuer des manipulations génétiques de routine (recombinaisons de deux mutations par exemple) en des temps relativement courts (quelques semaines). Enfin, le cycle de

reproduction court associé aux dispositifs comportementaux permettant d'accueillir des groupes de drosophiles de taille importante offre une dimension statistique exceptionnelle aux expériences de comportement.

II.2 Avantages techniques du modèle drosophile en neurobiologie

II.2.1 Contrôle spatial de l'expression génétique

Les décennies d'utilisation de la drosophile comme organisme modèle ont vu le développement d'outils génétiques de diversité et puissance inégalées chez les autres organismes modèles.

Les premiers mutants de mémoire ont été générés par la technique de mutation ponctuelle et aléatoire de mutagenèse à l'EMS (méthanesulfonate d'éthyle), dont les trois plus célèbres, et toujours étudiés, mutants de mémoire olfactive : *dunce* (*dnc*) (Dudai et al., 1976), *amnesiac* (*amn*) (Quinn et al., 1979) et *rutabaga* (*rut*) (Livingstone et al., 1984). Néanmoins, cette technique générant des mutations non traçables, il était difficile d'identifier les gènes affectés. C'est donc plus tardivement que les phénotypes dus aux mutations ont pu être reliés aux gènes et mécanismes moléculaires sous-jacents. Par exemple, il a fallu attendre 1986 pour connaître la fonction moléculaire de *dunce* (Chen et al., 1986).

D'autres outils génétiques plus précis sont apparus par la suite.

II.2.1.1 L'élément transposable P

L'élément transposable P est un élément naturel présent dans certaines souches de drosophile. Cet élément P a été cloné et modifié *in vitro* au cours des dernières décennies, en particulier par insertion de gènes rapporteurs. Ces éléments P modifiés ont été réintroduits dans le génome de la drosophile sous l'action d'une enzyme, la transposase (O'Kane and Gehring, 1987).

La remobilisation aléatoire de l'élément transposable P, dont le suivi est assuré grâce aux gènes rapporteurs, permet de générer des mutations. C'est par son insertion dans un gène particulier (partie codante ou régulatrice) que l'élément P peut affecter son expression et donc entraîner un phénotype mutant (par exemple de mémoire). Cette technique permet d'identifier facilement le locus d'insertion et le gène affecté, contrairement à la mutagenèse à l'EMS (S.-C. Lin et al., 2014).

Par ailleurs des éléments P modifiés ont été développés afin de visualiser et de manipuler des ensembles cellulaires précis. Le principe de cette approche dite "enhancer-trap" est que l'élément P contient un gène rapporteur sous la dépendance d'un promoteur minimal. L'expression du gène rapporteur peut alors être régulée par les séquences génomiques activatrices ("enhancers") ou inhibitrices modulant normalement l'expression du (ou des) gène(s) adjacents au point d'insertion de l'élément transposable. Cette technique « enhancer-trap » a permis, outre l'identification de nouveaux mutants, d'associer les structures cérébrales impliquées. Citons par exemple les mutants de mémoire aversive linotte (lio) (Dura et al., 1993), latheo (lat) (Boynton and Tully, 1992), identifiés d'abord sur la base d'un défaut de mémoire, ou bien leonardo (leo) identifié d'abord sur la base d'une expression dans le centre de la mémoire (Skoulakis and Davis, 1996). Cette approche a joué un rôle fondamental dans le développement des études fonctionnelles des circuits neuronaux chez la drosophile.

II.2.1.2 Le système UAS/Gal4

En 1993, Brand et Perrimon ont introduit chez la drosophile, via la technique d'enhancer-trap, des outils génétiques importés de la levure. On peut insérer dans des éléments P distincts la séquence d'ADN codant le facteur de transcription Gal4 de levure et la séquence activatrice UAS suivie de la séquence codante pour la protéine ou l'ARN que l'on veut exprimer. La séquence UAS est spécifiquement reconnue par le facteur de transcription Gal4 mais pas par les facteurs de transcription endogènes de la drosophile. On génère alors de façon indépendante des drosophiles portant le transposon avec la séquence Gal4 et d'autres portant le transposon avec la séquence UAS. On obtient finalement par croisement de ces deux souches des drosophiles d'intérêt contenant les deux types de transposons. La séquence Gal4 a un patron d'expression spécifique qui dépend des éléments génomiques régulateurs pour son point d'insertion. Par conséquent, le rapporteur, dont la séquence est en aval de la séquence UAS et qui n'est exprimée que si le facteur Gal4 est présent, s'exprime avec le même patron d'expression que le Gal4 (Figure 8) (Brand and Perrimon, 1993). Cet outil est d'autant plus puissant que des milliers de lignées Gal4 ont été générées avec des patrons d'expression identifiés, en particulier dans le système nerveux. Elles sont disponibles dans des banques publiques de drosophiles (BDSC, VDRC, DGRC par exemple). Il est donc désormais possible de surexprimer un gène (ARNm), de l'inhiber (ARNi), d'exprimer des rapporteurs fluorescents (tel que la GFP ; Figure 8), dans des structures spécifiques. Les dernières générations de lignées Gal4 ne marquent parfois que quelques neurones, voire un seul neurone, permettant une résolution spatiale remarquable.

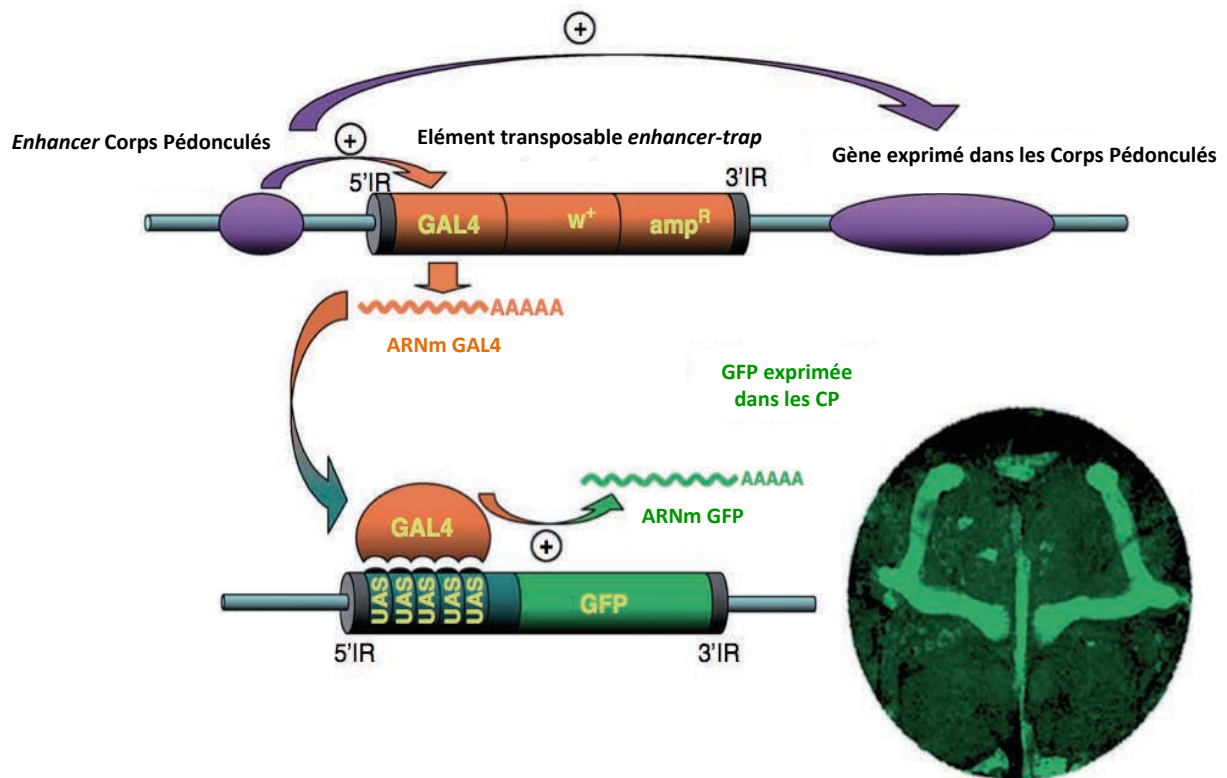


Figure 8 : Le système UAS/Gal4 permet une expression génétique à résolution spatiale

Quand un élément transposable enhancer-trap est inséré à proximité d'un enhancer de transcription contrôlant l'expression dans une structure donnée, le gène Gal4 contenu dans l'élément-P est exprimé dans la même structure. Si l'individu contient également un gène rapporteur en aval d'une séquence UAS, le Gal4 va induire la transcription du rapporteur. GFP: green fluorescent protein, CP: corps pédonculés (D'après Brand and Perrimon, 1993).

II.2.1.3 Le système Split-Gal4

Pour certains types cellulaires cependant, il est difficile de parvenir à obtenir des lignées Gal4 très précises en terme de populations ciblées. Face à cette problématique, depuis quelques années se développe une amélioration du système : il s'agit de l'outil Split-Gal4 (Luan et al., 2006; Pfeiffer et al., 2010).

Dans ce système, la protéine *enhancer* Gal4 est découpée en deux polypeptides, dont les gènes sont chacun sous le contrôle d'une séquence activatrice différente. Ainsi les deux hémi-protéines ne sont pas exprimées selon le même patron cellulaire. Seulement à l'intersection de ces deux patrons les cellules expriment les deux hémi-protéines, capables de reconstituer la protéine Gal4 complète, apte à induire l'expression du transgène d'intérêt, toujours sous le contrôle d'une séquence UAS. Les patrons d'expression ainsi créés sont extrêmement spécifiques (Figure 9).

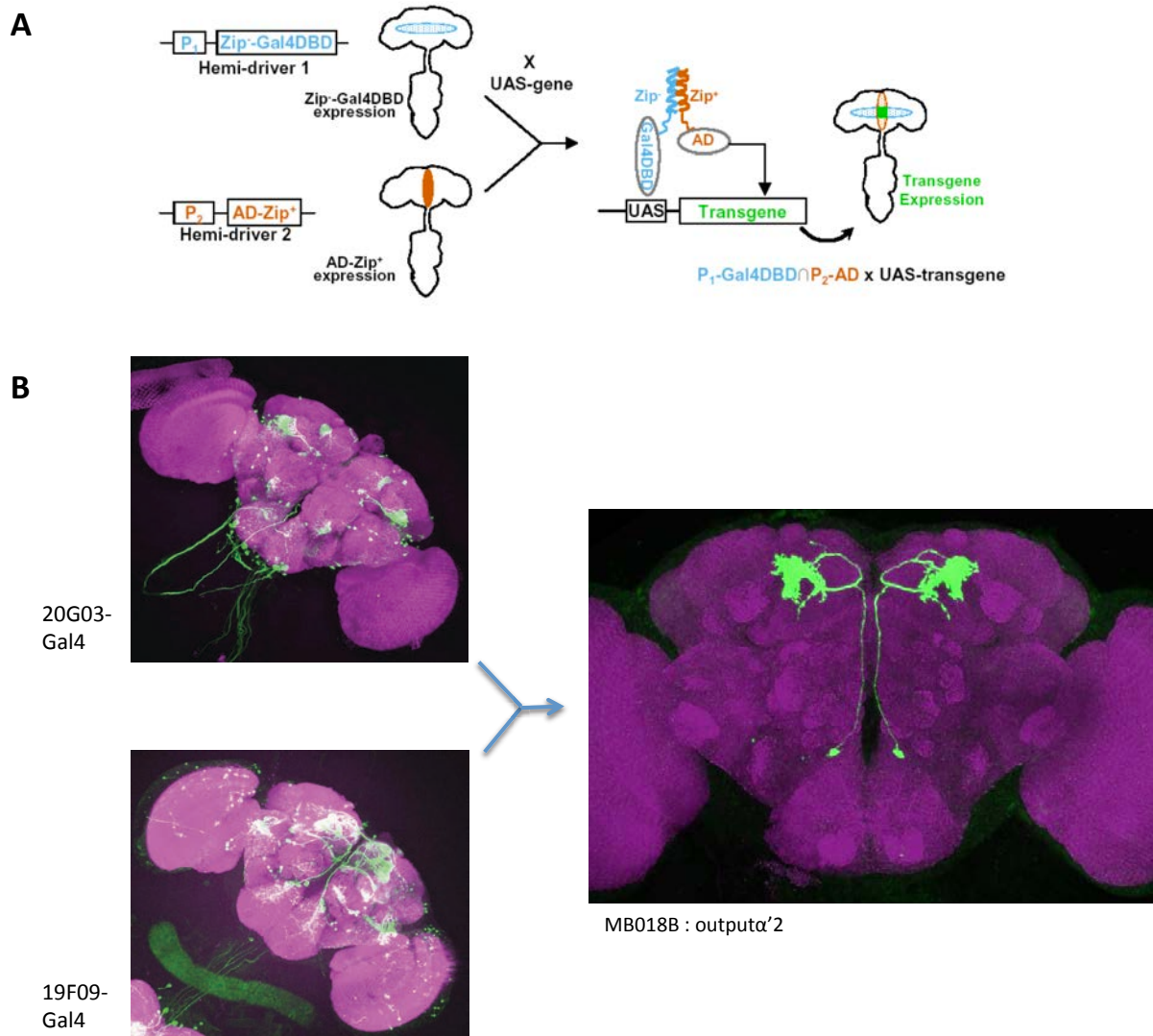


Figure 9 : Le système Split-Gal4

(A) Représentation schématique du fonctionnement du système Split-Gal4 : la protéine Gal4 classique est scindée en deux, une portion portant le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) et l'autre portant le domaine d'activation de la transcription (AD pour Activator Domain). Elle peuvent reconstituer la protéine Gal4 fonctionnelle, via l'adhésion de leurs domaines hélice à leucine (Leucine Zipper), à l'intersection de leurs propres patrons d'expression (Luan et al., 2006).

(B) Exemple : les lignées 20G03-Gal4 et 19F09-Gal4 aux patrons d'expression peu spécifiques ont été utilisées pour générer la lignée MB018B, dont le patron d'expression, correspondant à l'intersection des deux premiers, est très spécifique.

Des banques de milliers de lignées Split-Gal4 ont été créées récemment à Janelia Farm Research Campus pour pouvoir cibler tous les neurones des centres mnésiques chez la drosophile.

II.2.1.4 Contrôle de l'expression génétique : L'interférence par ARN

Potentiellement couplée aux systèmes Gal4/UAS et Target, l'interférence par ARN a révolutionné les études en perte de fonction. Cette technique, dérivant d'un mécanisme naturel de régulation de l'expression génétique (Carthew and Sontheimer, 2009), permet de réduire l'expression d'un gène cible. Chez la plupart des espèces animales et végétales lorsqu'un double brin d'ARN (« double strand RNA » ou dsRNA) est présent dans le cytoplasme d'une cellule, il est reconnu et découpé en fragments de 21 à 23 paires de bases appelés siRNA (« small interfering RNAi ») par l'enzyme Dicer, un système évolutivement issu d'une réponse à la présence d'ARN exogènes de type viral. Par la suite une association se forme entre les siRNA et le complexe protéique RISC (« RNA induced Silencing Complex »). Par activation ATP-dépendante les deux brins complémentaires des siRNA se dissocient. Ainsi le brin antisens va s'hybrider avec l'ARNm sens complémentaire induisant soit, sa dégradation, soit un arrêt du processus de traduction (Figure 10). Via l'élément P, il est possible d'insérer une séquence codante pour un siRNA directement en aval d'un UAS, et donc d'inhiber spécifiquement un gène donné dans un type cellulaire donné grâce à la spécificité du Gal4. De nouveau, une grande partie de l'intérêt de ce système dans le cadre des études chez la drosophile est l'existence de banques de drosophiles contenant des transposons du type UAS-(ARN interférant) pour presque n'importe lequel des 14.000 gènes de la drosophile (banques TRiP, VDRC et NIG).

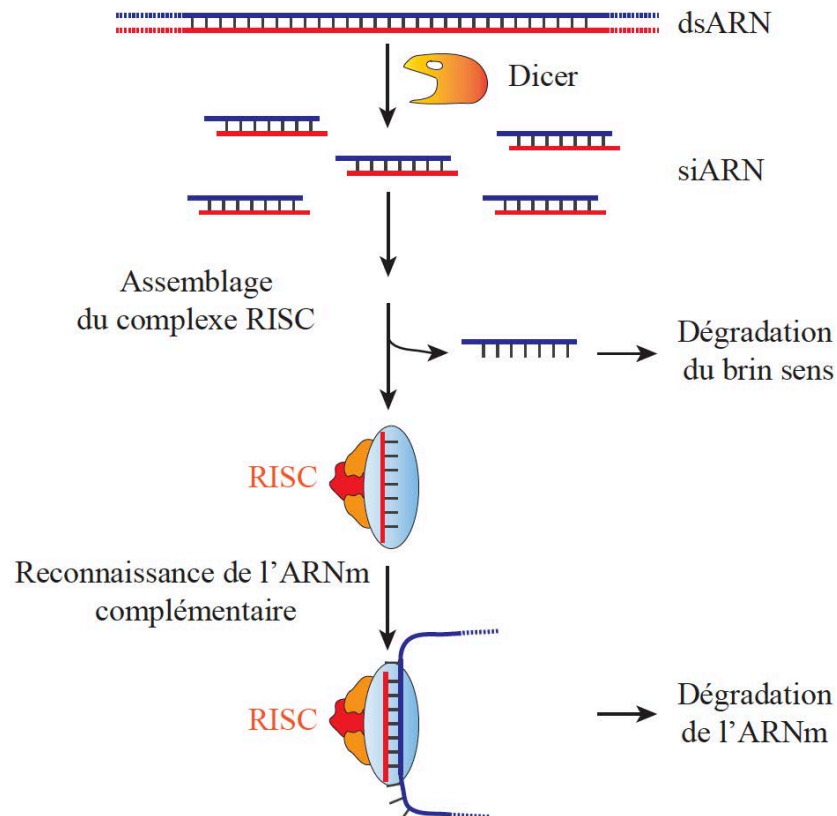


Figure 10 : Mécanismes de l'interférence par ARN

Les fragments d'ARN double-brins se trouvant dans la cellule sont reconnus et clivés par l'enzyme Dicer générant de petits fragments d'ARN interférents doubles brins. L'assemblage avec le complexe protéique RISC induit le relargage et la dégradation du brin sens, tandis que le brin antisens peut s'hybrider avec d'éventuels ARNm de séquence complémentaire. Cela induit à terme la dégradation de l'ARNm cible. dsARN: ARN double brin, siARN: petits ARN interférents (adapté de Carthew and Sontheimer, 2009).

II.2.1.5 Le système Target

L'absence de résolution temporelle du système Gal4/UAS peut conduire à des aberrations lors du développement de l'organisme. Si l'on veut pouvoir attribuer un rôle à une protéine dans un processus cérébral dans son fonctionnement à l'âge adulte, il est intéressant de pouvoir réaliser un « knock-down » conditionnel, spécifiquement chez la drosophile adulte. Dans cette optique, le système Gal4/UAS a été amélioré pour permettre un tel contrôle à la fois spatial et temporel. L'approche dite TARGET repose sur la protéine Gal80, un inhibiteur de l'activité de la protéine Gal4, dont une version mutante thermosensible, Gal80^{ts}, a été obtenue. Son expression est ubiquitaire grâce à l'adjonction d'un promoteur tubuline : on parle alors de l'outil tub-Gal80^{ts} qui permet de contrôler l'activité du GAL4 par la

température (McGuire et al., 2003) (Figure 11). A température permissive (<math> < 30^{\circ}\text{C}</math>) la protéine Gal80^{ts} a sa configuration normale et se fixe au Gal4 et empêche son activité transcriptionnelle. Par contre à température restrictive (>30°C), la protéine Gal80^{ts} change de conformation et ne reconnaît plus le Gal4, permettant ainsi au Gal4 de reconnaître l'UAS et d'activer la transcription du gène en aval de l'UAS.

	Durant le développement	A l'âge adulte	Phénotype
(a) GAL4, UAS-RNAi	<p>Gal4 CP spécifique</p> <p>RNAi</p> <p>RNAi</p>	<p>Gal4 CP spécifique</p> <p>RNAi</p> <p>RNAi</p>	<p>Déficits mnésiques potentiellement dus à des défauts structurels (ARNi durant le développement)</p>
(b) GAL4, UAS-RNAi GAL80 ^{ts}	<p>Basse température</p> <p>Gal4 CP spécifique</p> <p>Gal80^{ts}</p> <p>RNAi</p> <p>RNAi</p>	<p>Haute température</p> <p>Gal4 CP spécifique</p> <p>RNAi</p> <p>RNAi</p> <p>GAL80^{ts}</p>	<p>Déficits mnésiques spécifiques (action des ARNi à l'âge adulte seulement)</p>

Figure 11 : La résolution spatio-temporelle du système TARGET permet d'éviter les défauts développementaux

Une séquence codant pour un ARN interférent (ARNi) est placé sous le contrôle d'un UAS. (A) Le Gal4 active l'expression de l'ARNi durant le développement et au stade adulte. Un défaut de mémoire peut être causé indirectement par un défaut structurel pendant le développement. (B) Le système TARGET permet de résoudre ce problème. Les drosophiles sont maintenues à basse température durant leur développement. A cette température, le Gal80^{ts} inhibe l'activité transcriptionnelle du Gal4, donc aucun ARNi n'est exprimé. Au stade adulte, les drosophiles sont transférées à température permissive (30,5°C); la protéine Gal80^{ts} devient inefficace et le Gal4 active la transcription de l'ARNi dans les CP adultes. Les éventuels défauts de mémoire sont alors imputables à la diminution de la concentration de l'ARNm ciblé par l'ARNi. CP: corps pédonculés, ARNi: ARN interférent (D'après McGuire et al., 2003).

II.2.2 Contrôle de l'activité neuronale

Différents outils, qui peuvent être couplés au système Gal4/UAS, permettent de contrôler l'activité neuronale avec une résolution temporelle extrêmement fine. Leur

induction peut être obtenue par des changements de température ou par une excitation lumineuse. Voici 2 exemples d'outils que j'ai utilisés au cours de ma thèse.

II.2.2.1 Inhibition de l'activité synaptique grâce à Shibire^{ts}

Le gène *shibire* (*shi*) encode une dynamine impliquée dans les processus d'endocytose, qui est essentielle pour le recyclage des vésicules synaptiques (Figure 12). En 2001 a été développé un allèle dominant négatif thermo-sensible de ce gène, *shi*^{ts1} (Kitamoto, 2001). Il a pour effet de bloquer le recyclage des vésicules synaptiques à température restrictive (>29°C), ce qui a pour conséquence d'entraîner un blocage rapide et réversible (lorsque la température baisse) de la transmission synaptique (Figure 12). Ainsi en exprimant le transgène UAS-Shi^{ts} via un pilote d'expression Gal4, on peut contrôler l'activité de neurones spécifiques avec une résolution temporelle de quelques secondes à quelque minutes. Cette technique a été utilisée dans de nombreuses études visant à identifier les populations neuronales impliquées dans les processus mnésiques (Kitamoto, 2002).

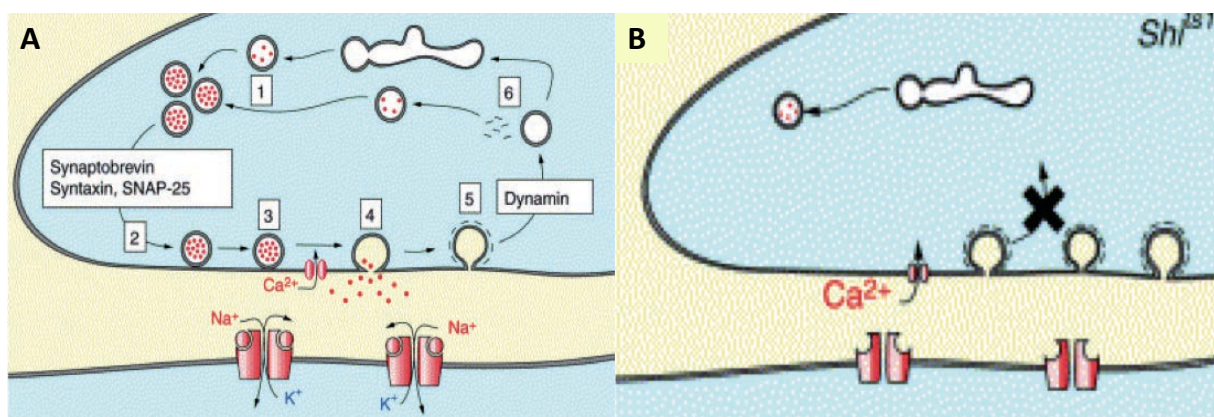


Figure 12 : Shibire^{ts} permet l'inhibition de la transmission synaptique

(A) La neurotransmission implique le relargage de neurotransmetteurs en réponse à une dépolarisation induite par l'entrée de calcium présynaptique. Le relargage de neurotransmetteurs requiert: 1) la formation de vésicules synaptiques les contenant; 2) l'amarrage des vésicules à la membrane; 3) la préparation des vésicules à la fusion; 4) l'exocytose des neurotransmetteurs par fusion membranaire en réponse à l'entrée calcique; 5) l'endocytose des vésicules via la clathrine; 6) le recyclage des vésicules synaptiques. (B) L'allèle mutant thermosensible de *shibire*, *Shi^{ts}* est dominant. A température restrictive (33°C), l'endocytose est bloquée, ce qui conduit à la déplétion des stocks de vésicules, et abolit rapidement la transmission synaptique. Ce blocage est réversible : dès que la température redescend sous le seuil, l'endocytose peut reprendre, le stock de vésicule se reformer et la neurotransmission s'accomplir (adapté de Kitamoto et al., 2002).

II.2.2.2 Activation neuronale par la température via dTRPA1

La protéine dTRPA1 est l'orthologue du canal TRPA1 chez les mammifères. La super famille des TRP (Transient Receptor Potential) comprend un large groupe de canaux cationiques et présente divers rôles dans la physiologie sensorielle (Montell, 2005). Plus particulièrement, la sous-famille TRPA est impliquée dans la perception de la température. dTRPA1 est activée par des températures supérieures à 27°C (Rosenzweig et al., 2005). En l'exprimant artificiellement dans des neurones précis, une nouvelle fois grâce au système Gal4/UAS-dTRPA1 permet un fonctionnement normal de ceux-ci à température restrictive (<27°C) et leur activation aigue à température permissive (>27°C) (Hamada et al., 2008).

II.2.3 Imagerie *in-vivo*

En dépit des similitudes évoquées plus haut entre le cerveau de drosophile et celui des mammifères, il reste que les corps cellulaires des neurones sont bien plus petits chez la drosophile (moins de 5µm, alors qu'un neurone classique de mammifère fait 20µm). Cela est un handicap majeur dans l'étude de la physiologie neuronale par électrophysiologie, même si quelques laboratoires commencent à y parvenir chez l'adulte (Jayaraman and Laurent, 2007; Murthy et al., 2008; Turner et al., 2008). Pour pallier cette restriction, les drosophilistes se sont tournés préférentiellement vers l'utilisation de techniques optiques utilisant des rapporteurs fluorescents génétiquement encodés. Plusieurs sondes de ce type ont été mises au point, permettant de suivre différents types d'activité. Même si les sondes génétiquement encodées sont en général moins performantes que d'autres rapporteurs fluorescents synthétiques disponibles, l'intérêt évident est de pouvoir cibler précisément et de manière très reproductible l'expression de ces sondes dans les neurones d'intérêt. Il y a d'abord des sondes d'activité neuronale comme la sonde spH (Miesenböck et al., 1998) qui mesure les variations de pH synaptique liées à l'exocytose, ainsi que les sondes calciques telles que GCaMP (Tian et al., 2009) et voltages ArcLight (Jin et al., 2012) qui rendent compte de l'activité électrique des neurones. Par ailleurs, des sondes rapporteuses d'activité biochimiques viennent compléter les possibilités d'étude : on peut ainsi mesurer des variations de concentration d'AMPc ou d'activité PKA (avec la sonde AKAR (Zhang et al., 2001)), PKC, etc.

II.2.3.1 Imagerie calcique

La concentration en calcium intracellulaire reflète directement l'activité électrique des neurones, puisqu'en général des canaux calciques sensibles au potentiel ou des récepteurs ionotropiques permettent un influx de calcium dans le cytoplasme. Rendre compte des variations de concentration en calcium est donc extrêmement indicatif.

La sonde GCaMP, dont la première version fut développée en 2001 (Nakai et al., 2001), provient de la fusion entre une protéine GFP, la calmoduline et un domaine M13. En présence de calcium, la calmoduline se lie au domaine M13 et induit une augmentation de la fluorescence par changement de conformation. Les dernières versions de cette sonde possèdent des qualités en termes de photostabilité, sensibilité et vitesse qui en font la sonde calcique encodée génétiquement de référence actuellement. Nous l'utilisons en routine au laboratoire et elle a participé à des découvertes phares de notre équipe comme la formation de traces mnésiques (Séjourné et al., 2011), ou l'implication de neurones dopaminergiques oscillants dans la consolidation de la mémoire olfactive aversive à long terme (Plaçais et al., 2012).

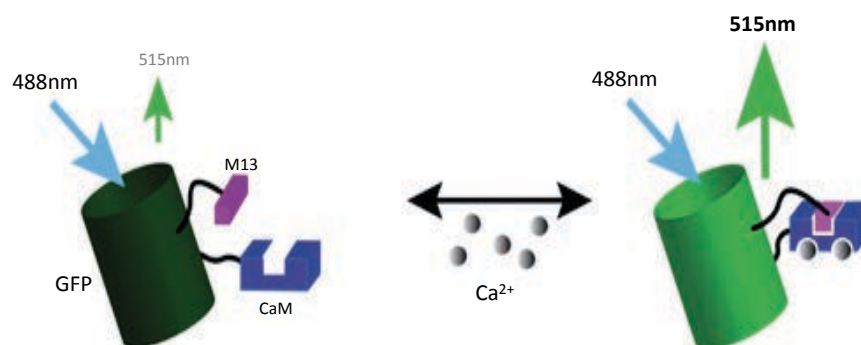


Figure 13 : Principe de la sonde calcique GCaMP

La sonde GCaMP lie le calcium par sa séquence CaM, ce qui résulte en un changement conformationnel de la GFP, induisant une augmentation de l'émission fluorescente (Riemensperger et al., 2012).

II.2.3.2 Imagerie de l'activité PKA

D'autres processus intracellulaires méritent d'être suivis en temps réel pour comprendre la physiologie des neurones. Parmi eux, la voie de signalisation de l'AMPc/PKA est fondamentale. Dans le cadre de la mémoire en particulier, elle relie les premières étapes de l'apprentissage au développement de la mémoire consolidée (Skoulakis et al., 1993). Un

rapporteur d'activité de la PKA a pu être développé dans cette optique : il s'agit de la sonde AKAR (A-Kinase Activity Reporter (Zhang et al., 2001)). AKAR est une sonde FRET ratiométrique encodée génétiquement, composée d'un fluorophore donneur (CFP) et d'un fluorophore accepteur (YFP). Le donneur et l'accepteur sont reliés par une séquence peptidique contenant un site consensus de phosphorylation (site substrat) de la PKA fusionné avec un domaine protéique reconnaissant spécifiquement la séquence consensus phosphorylée. L'activation de la PKA par l'AMPC permet la phosphorylation de la sonde au niveau du site substrat. Ce dernier est ensuite reconnu par le site de liaison des phosphoaminoacides, ceci induisant un changement de conformation de la sonde permettant un rapprochement des fluorophores. Lors de l'excitation par laser de la CFP (le donneur), le rapprochement permet un transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur (principe du FRET) : il y a émission de fluorescence non plus à la longueur d'onde d'émission de la CFP, mais à longueur d'onde d'émission de l'YFP. Ce changement de signal reflète ainsi la balance entre l'activité activatrice de la PKA, et inhibitrice des phosphatases (figure 19). En 2010, ce rapporteur a été introduit avec succès chez la drosophile par notre équipe, et a permis de décrypter un processus moléculaire d'activation synergique de l'adénylate-cyclase rutabaga (Gervasi et al., 2010) par l'acétylcholine et la dopamine, semblable à celui mis en jeu lors de l'apprentissage associatif.

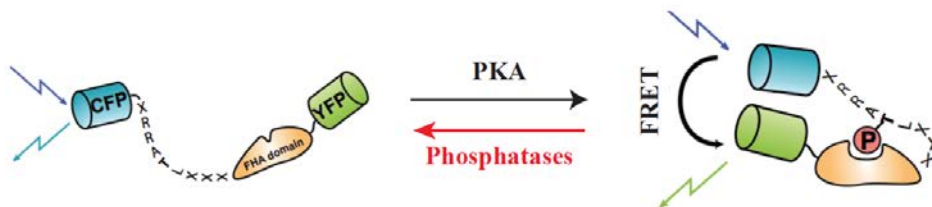


Figure 14 : Principe de la sonde AKAR

La sonde est composée de deux fluorophores, un donneur (CFP) et un accepteur (YFP). Une séquence peptidique contenant un site substrat de la PKA est inséré entre les deux fluorophores. Lorsque la PKA est activée, elle peut phosphoryler le site substrat de la sonde et provoquer un changement de configuration de la sonde. Un transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur s'opère, rapportant ainsi la balance entre l'activité de la PKA et des phosphatases (D'après Zhang et al., 2001).

III. Différentes formes de mémoire existent chez la drosophile

Malgré sa relative simplicité, en comparaison aux mammifères notamment, la drosophile dispose de plusieurs formes de mémoires, lui permettant de soutenir différents

apprentissages. Il existe en particulier plusieurs types de mémoire associative olfactive qui diffèrent en terme de décours, de support neuronal et moléculaire. Nous allons ici faire une description comportementale de ces formes de mémoire dont la richesse participe à l'intérêt de la drosophile comme modèle d'étude en neurosciences et qui pour la plupart trouvent leurs équivalents chez les autres espèces animales.

Nous allons commencer par présenter comment l'on peut induire, en pratique, un apprentissage olfactif chez la drosophile.

III.1 Les protocoles comportementaux de mémoire associative olfactive

Un certain nombre de paradigmes expérimentaux ont été développés pour l'étude des différents comportements de la drosophile tels que la mémoire visuelle (Wolf and Heisenberg, 1990), la mémoire de parade nuptiale (Siegel and Hall, 1979; Tompkins et al., 1983), et surtout les mémoires olfactives associatives aversive et appétitive (Quinn et al., 1974 ; Tempel et al., 1983).

Les protocoles expérimentaux utilisés pour former les mémoires associatives olfactives reposent sur des conditionnements de type pavlovien. Les drosophiles en groupe apprennent à associer un stimulus inconditionnel (induisant une réponse réflexe) à un stimulus conditionnel (de valence initialement neutre). Par association, ce stimulus neutre acquiert une valence et déclenchera chez l'animal une réponse conditionnée équivalente à celle induite par le stimulus inconditionnel lors d'une présentation ultérieure du stimulus conditionné.

Dans le protocole de conditionnement appétitif (Tempel et al., 1983), le stimulus inconditionnel (SI) est du sucre et le stimulus conditionnel (SC+) qui lui sera associé est une odeur. On présente également une seconde odeur non associée au sucre (SC-), qui sert de contrôle interne à l'expérience (Figure 15). Pour motiver les drosophiles à chercher à se nourrir, ce qui est nécessaire pour former l'association, elles sont mises à jeuner préalablement au conditionnement. Après apprentissage, l'odeur conditionnée devient prédictive du sucre et déclenche un comportement d'attraction chez l'individu. Lors du test de rappel de mémoire, les individus sont confrontés à deux compartiments odorants, l'un avec le SC+ et l'autre avec le SC- (Figure 16). Notons que le conditionnement associatif olfactif appétitif présente l'avantage de correspondre à un comportement naturel de la drosophile, puisque celle-ci doit être en mesure de trouver les bonnes ressources nutritionnelles lorsque ses réserves sont basses.

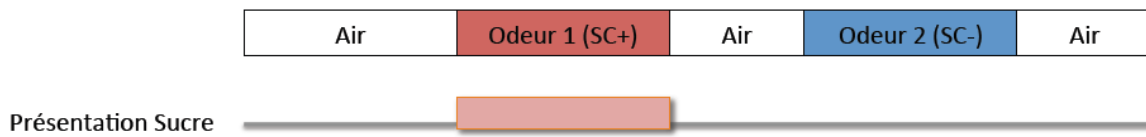


Figure 15 : Schéma du paradigme olfactif appétitif

Le cycle de conditionnement comporte une première association odeur-sucre, suivie d'une présentation d'odeur non couplée à un stimulus appétant.

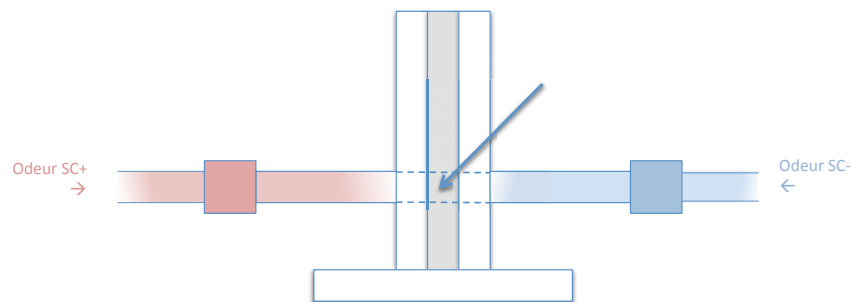


Figure 16 : Test de rappel mnésique

Pour tester la mémoire d'un groupe de drosophile, on les place au centre du T-maze (flèche), à la confluence des deux odeurs utilisées lors du conditionnement (odeur SC+ et odeur SC-). Il s'agit donc d'un test discriminatif, puisque les drosophiles choisissent une odeur relativement à l'autre.

Dans le cadre du protocole olfactif associatif aversif, développé il y a bien plus longtemps (Quinn et al., 1974), le stimulus inconditionnel est une succession de décharges électriques. L'odeur SC+ deviendra donc prédictive d'un stimulus aversif et les drosophiles chercheront à l'éviter, si tant est qu'elles se souviennent de ce qu'elles ont appris. Similairement à l'appétitif, le test de rappel offre le choix aux drosophiles entre deux compartiments chargés des deux odeurs utilisées pendant le conditionnement.

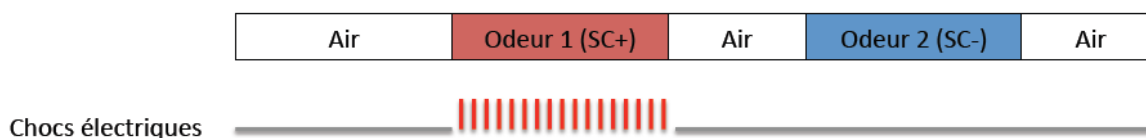


Figure 17 : Schéma du paradigme olfactif aversif

Le cycle de conditionnement comporte une première étape où une odeur est associée à des chocs électriques : elle devient le stimulus conditionné (SC+). Par la suite, une seconde odeur (SC-) est présentée sans punition.

Pour l'aversif comme pour l'appétitif, on distingue donc trois étapes dans nos expériences : l'apprentissage, durant lequel les drosophiles sont conditionnées ; la consolidation, période de repos durant laquelle la mémoire formée peut évoluer et être encodée sous des formes plus stables ; le rappel, qui correspond à la remobilisation de l'information apprise, à savoir qu'une odeur présente une valence, et à la mise en œuvre du comportement adapté.

III.2 Formes de mémoire aversive

Avec le protocole aversif, les drosophiles apprennent à associer une odeur à une perception négative. L'association initiale peut être modulée par le nombre de cycles de conditionnement et la fréquence de ces cycles le cas échéant. De plus, pour un même protocole de conditionnement, le temps auquel est effectué le test de rappel va déterminer la ou les forme(s) de mémoire étudiée(s). Pour considérer un type précis de mémoire, il faut donc être attentif au protocole utilisé et au temps auquel on effectue le test.

III.2.1 Les différentes formes de mémoire

III.2.1.1 Les formes de mémoire labile

Outre leur durée, une distinction essentielle entre les formes de mémoire relève de leur caractère labile ou consolidé. Une mémoire labile est instable, affectée par l'anesthésie, par exemple l'anesthésie par le froid, et sujette à l'effacement.

Ainsi, après un cycle de conditionnement, on peut distinguer une composante labile quand on teste la mémoire immédiate (à 5 min), mais également quand on réalise le test à 2/3 heures (Figure 18). Cependant, des expériences fondatrices (Tully and Quinn, 1985) ont permis de différencier ces deux cas : la mémoire labile immédiate relève principalement de la forme de mémoire dépendant du gène *rutabaga* qu'on nomme Mémoire à Court Terme (MCT), tandis que la mémoire labile observée à 2/3 heures relève principalement de la forme dépendant du gène *amnesiac* qu'on nomme Mémoire à Moyen Terme (MMT) (Figure 18 C).

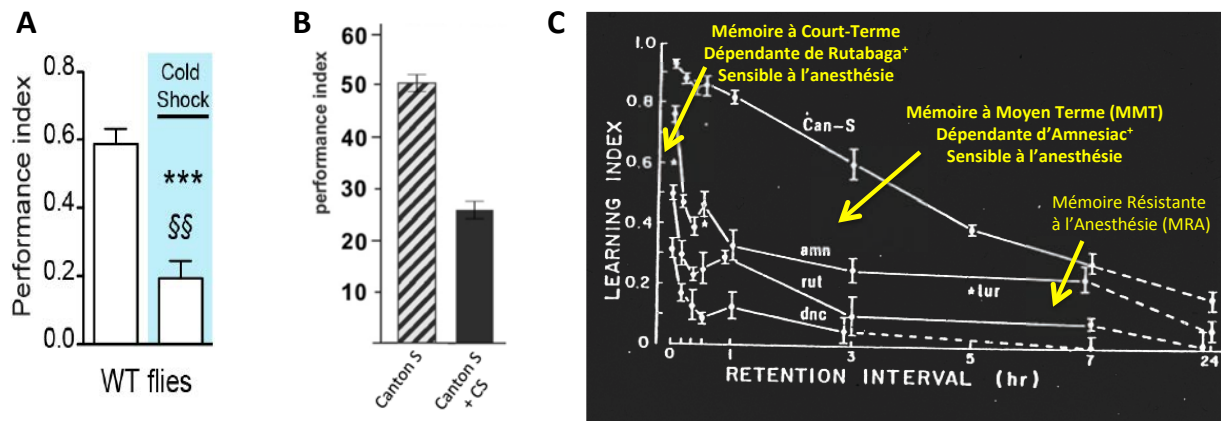


Figure 18 : Mémoires labiles

Les mémoires immédiate (A) et à 3h (B) sont sensibles à l'anesthésie par le froid (Bouzaiane et al., 2015 ; Scheunemann et al., 2012). La majeure partie de la mémoire immédiate dépend du gène *rutabaga* : c'est la MCT. Et la majeure partie de la mémoire à 3h dépend du gène *amnesiac* : c'est la MMT (scores en %) (Tully and Quinn, 1985).

III.2.1.2 La Mémoire Résistante à l'Anesthésie (MRA)

Il existe plusieurs formes de mémoire consolidées, c'est à dire suffisamment stabilisées pour résister aux traitements qui affectent les formes labiles de mémoire, et qui peuvent avoir une plus longue persistance. La première est la Mémoire Résistante à l'Anesthésie (MRA).

La MRA est une mémoire formée dès un cycle de conditionnement et qui peut perdurer plus de 24 heures. Elle correspond aux fractions de la mémoire non effacées par l'anesthésie par le froid, tant à 5 minutes qu'à 3 heures (Figure 18). En répétant, de façon consécutive les cycles de conditionnement (ce que l'on nomme conditionnement massé), on forme une MRA de meilleure qualité qu'avec un seul cycle de conditionnement. Cette mémoire est insensible au traitement par la CXM, un inhibiteur de la synthèse protéique: sa mise en place ne nécessite pas de néo-synthèse protéique suite au conditionnement (Figure 19). Ses caractéristiques restent mal connues.

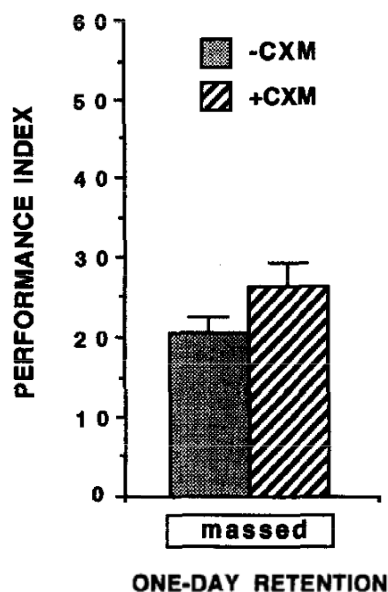


Figure 19 : La Mémoire Résistante à l'Anesthésie ne requiert pas de néo-synthèse protéique

Le traitement par l'inhibiteur de synthèse protéique CXM n'affecte pas les scores de MRA à 24h après 5 cycles de conditionnement massés (scores en %) (Tully et al., 1994).

D'après les récents travaux de Bouzaiane et al., 2015 au laboratoire, les MRA observées à 5 minutes, à 3 heures ou à 24 heures doivent être dissociées en plusieurs sous-types, du fait qu'elles soient remobilisées à partir de populations neuronales différentes. On parle alors respectivement de ST-ARM, MT-ARM et LT-ARM. Cependant, la littérature dans ce domaine confond largement ces sous-types désignées sous le terme commun de MRA, en particulier parce qu'un mutant du gène *rsh* présente un défaut de MRA quelle que soit le protocole utilisé (Folkers et al., 1993).

III.2.1.3 La mémoire à long terme (MLT)

La mémoire consolidée par excellence est la Mémoire à Long Terme (MLT), qui perdure plus d'une semaine (Figure 20) (Tully et al., 1994). La formation de la MLT nécessite un protocole de conditionnement multiple (au moins 5 cycles) comprenant des intervalles de repos (typiquement de 15 minutes). La MLT ainsi mise en évidence correspond à la MLT telle qu'elle s'entend chez les mammifères, car elle requiert une nouvelle synthèse protéique après conditionnement : les drosophiles ayant ingéré de la cycloheximide (CXM), un inhibiteur de synthèse protéique, présentent un défaut de mémoire après conditionnement espacé. La formation de la MLT met en jeu l'activation du facteur de transcription CREB et

son co-activateur, la CBP (Hirano et al., 2013). Des mutants spécifiques de MLT tels que *crammer* (Comas et al., 2004) et *tequila* (Didelot et al., 2006) ont participé à la compréhension des mécanismes de formation de la MLT.

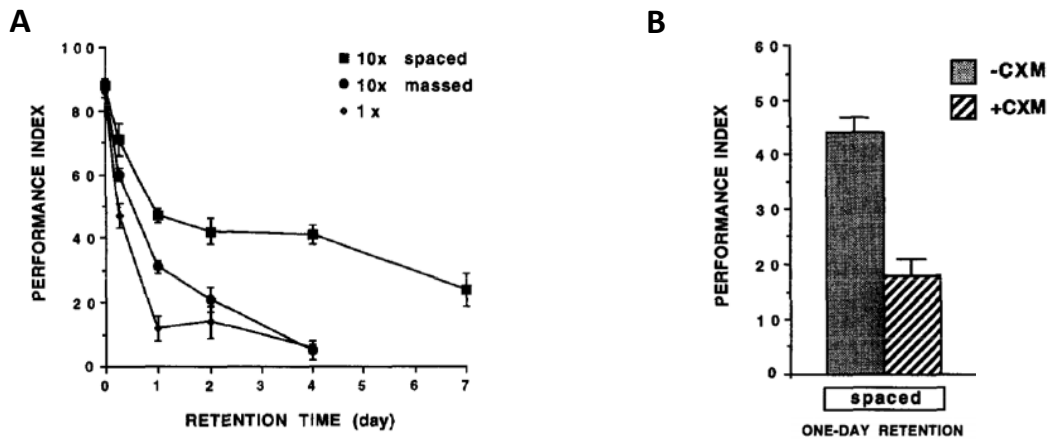


Figure 20 : La MLT est formée après un conditionnement espacé et dépend de la synthèse protéique *de novo*

La MLT formée après conditionnement multiples espacés peut durer plus d'une semaine (A). La formation de la MLT dépend de la synthèse protéique (B) (scores en %) (Tully et al., 1994).

Une représentation schématique du déroulé temporel des différentes formes de mémoire que nous venons d'évoquer est proposée en Figure 21.

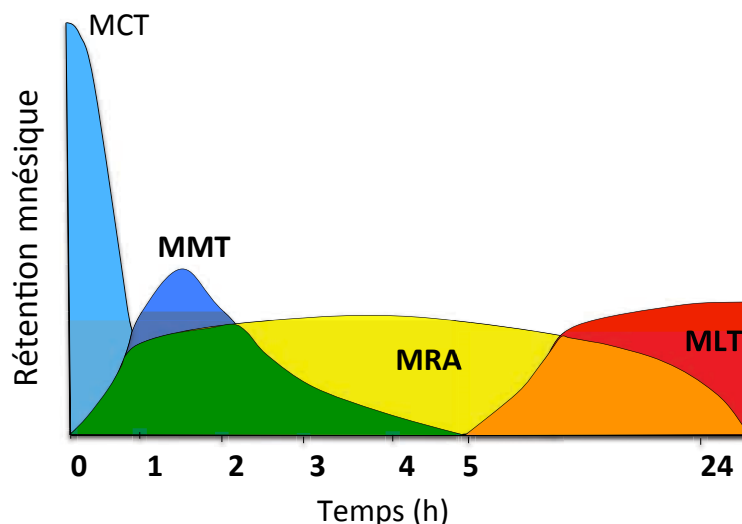


Figure 21 : Courbes de rétention mnésique relatives aux différentes formes de mémoire

La rétention mnésique macroscopique des drosophiles comprend différentes composantes, ayant des décours temporels différents.

III.3 Formes de mémoire appétitive

Chez la drosophile, comme chez nombre d'autres espèces, les individus ne sont pas attirés par la nourriture s'ils sont dans un état de satiété (Aceves-Piña et al., 1983). Le jeûne induit une baisse des réserves métaboliques ayant pour conséquence l'augmentation du comportement de recherche de nourriture (Pitman et al., 2009; Saper et al., 2002), une augmentation de la préférence au sucre, ainsi que l'augmentation de la probabilité d'extension du proboscis en réponse à une nourriture sucrée (Chabaud et al., 2006; Kim and Rulifson, 2004; Lee and Park, 2004; Wang et al., 2008).

III.3.1. Le conditionnement appétitif et les mémoires appétitives

Le conditionnement appétitif découle de la capacité des drosophiles à être attirées par une odeur ayant au préalable été associée à un stimulus appétant, le sucrose (Aceves-Piña et al., 1983; Colomb et al., 2009; Krashes and Waddell, 2008; Schwaerzel et al., 2003).

En toute logique écologique, les drosophiles sont capables de former de la MLT appétitive. Cependant, il est particulièrement intéressant de relever que contrairement à l'avérsif où un conditionnement espacé est requis, il suffit en appétitif d'opérer un cycle unique de conditionnement pour former aussi bien de la MCT que de la MLT (Figure 22) (Colomb et al., 2009; Krashes and Waddell, 2008). Récemment, il a été montré que la néo-synthèse protéique implique le co-activateur transcriptionnel CRTC, potentialisant la promotion transcriptionnelle de CREB au niveau des CP (Hirano et al., 2013).

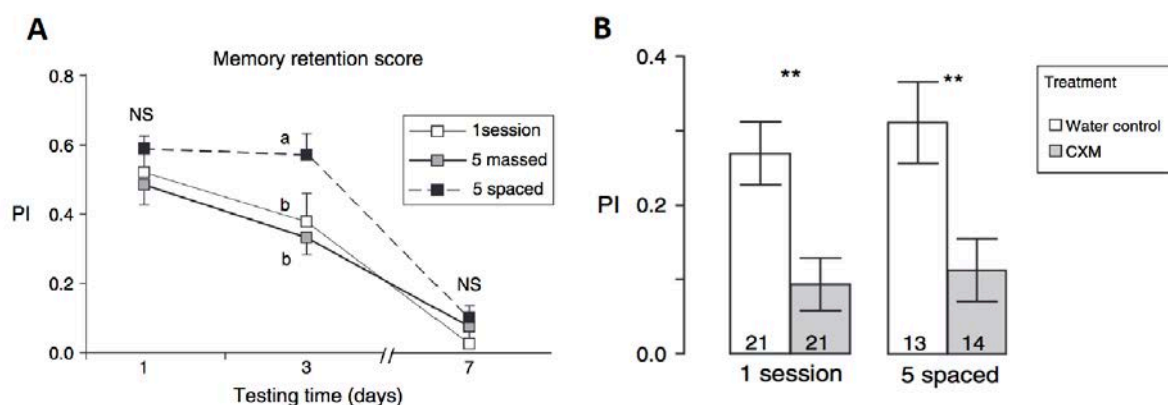


Figure 22 : La MLT appétitive est formée dès un cycle de conditionnement

La mémoire appétitive formée avec un cycle dure plusieurs jours (A) et est dépendante de la synthèse protéique (Colomb et al., 2009).

IV. La mémoire olfactive dans le cerveau de la drosophile

Les études de la mémoire chez la drosophile ont commencé il y a déjà une quarantaine d'années et ont permis de grandes avancées quant à la description des formes de mémoire et de la caractérisation des gènes impliqués. En revanche, ce n'est que récemment que les circuits neuronaux, sur lesquels repose la mémoire, ont commencé à être étudiés grâce aux progrès techniques dont a bénéficié la biologie en général et le champ de la drosophile en particulier. A ce niveau, beaucoup restait à découvrir, et c'est dans ce cadre que ma thèse s'est inscrite. Pour pouvoir mieux comprendre les enjeux de ma thèse, nous allons dresser un bilan des connaissances acquises en matière d'anatomie et de réseaux neuronaux dans la perspective de la mémoire olfactive.

IV.1 Vue globale sur l'anatomie fonctionnelle du cerveau de drosophile

Le système nerveux central de la drosophile se compose de deux parties : la chaîne nerveuse ventrale thoracique et abdominale reliée au système nerveux périphérique (une partie est située dans la capsule céphalique) et le cerveau constitué d'environ 100.000 neurones (Figure 23) (Ito et al., 1997).

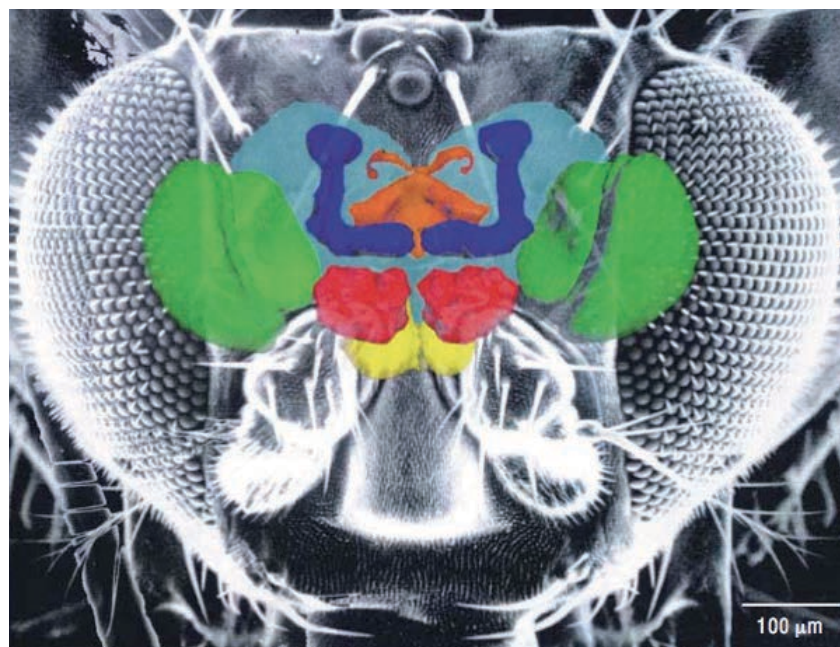


Figure 23 : Le cerveau de drosophile au sein de sa capsule céphalique

Représentation schématique des principales zones de neuropile. Vert: lobes optiques; jaune: ganglion sous-oesophagien; rouge: lobes antennaires; bleu: corps pédonculés; orange: complexe central. Les autres régions

neuropilaires entourant les corps pédonculés et le complexe central sont colorées en turquoise (Heisenberg, 2003).

Chez la drosophile, la majorité des neurones est de type unipolaire. Leurs corps cellulaires sont ségrégués en périphérie du cerveau, tandis que les projections dendritiques et axonales sont plus internes. La région, interne, où s'établissent les synapses entre axones et dendrites est appelée neuropile (Figure 24).

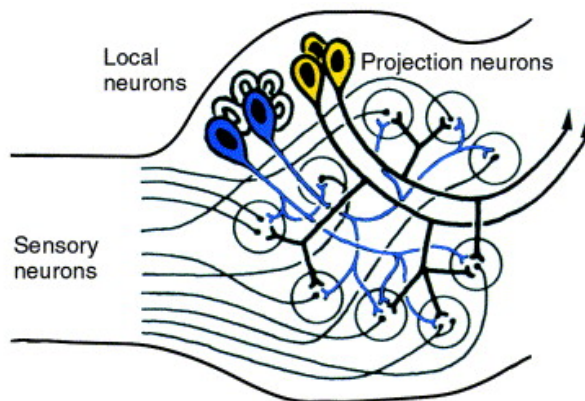


Figure 24 : Représentation schématique du neuropile

Représentation schématique d'une partie du cerveau de drosophile, le lobe antennaire, illustrant le concept de neuropile : les corps cellulaires des différents neurones sont en périphérie, tandis que les connexions qui s'établissent entre eux sont au centre, formant le neuropile (Bicker, 1998).

Le cerveau peut être divisé en trois grandes parties, le protocérébrum, le deutocérébrum et le tritocérébrum.

Le protocerebrum est considéré comme le neuromère principal du fait de sa taille et de sa complexité. Un grand nombre de neurones composent des structures dont le rôle et l'anatomie sont clairement identifiées, mais il subsiste des régions moins décrites. Voici une liste de quelques-unes des structures connues.

- Les lobes optiques, essentiels pour le traitement des informations visuelles représentent à eux seuls environ 50.000 neurones, soit plus de la moitié des neurones composant le cerveau.
- La pars intercerebralis qui via ses neurones sécréteurs d'insuline projetant sur les corpora cardiaca et corpora allata représente l'équivalent fonctionnel du système

hypothalamo-hypophysaire des vertébrés (Cao et al., 2013; Géminard et al., 2009; Leopold and Perrimon, 2007; Taguchi and White, 2008).

- Le complexe central, qui se compose de 20.000 neurones, et par sa position centrale reçoit quantité d'afférences d'une grande partie du cerveau. Il joue un rôle important dans les processus locomoteurs (Martin et al., 1999).

- La corne latérale (CL) recevant des afférences en provenance des centres d'intégrations olfactifs. Elle serait impliquée dans la réponse innée aux stimuli olfactifs (Jefferis et al., 2007).

- Les Corps Pédonculés (CP) sont impliqués dans nombre de processus. Citons le comportement de parade nuptiale (McBride et al., 1999; Mehren et al., 2004), les processus de généralisation de contextes visuels (bien que les CP ne sont généralement pas requis pour les processus visuels) (Liu et al., 1999; Wolf et al., 1998), la locomotion (Martin et al., 1998), le sommeil (Pitman et al., 2006; Yuan et al., 2006) et bien entendu la mémoire olfactive aversive (de Belle and Heisenberg, 1994; Dubnau et al., 2001; Heisenberg et al., 1985; McGuire et al., 2001; Zars et al., 2000) et appétitive (Kim et al., 2007; Krashes and Waddell, 2008; Schwaerzel et al., 2003; Trannoy et al., 2011). Les CP reçoivent les informations olfactives via les neurones de projections (NP) provenant des lobes antennaires (LA). Les CP sont considérés comme étant l'un des centres de traitement olfactif de second ordre et ont été impliqués dans la réponse innée aux odeurs attractives (Tanaka et al., 2008; Wang et al., 2003), mais dans la réponse innée aux odeurs utilisées classiquement pour le conditionnement olfactif aversif ou appétitif (de Belle and Heisenberg 1994).

Le deutocerebrum est pour sa part composé de nombreuses structures impliquées dans la perception des différentes sensorialités, telles que la gravité et l'ouïe (Boekhoff-Falk, 2005; Kamikouchi et al., 2009) grâce à l'organe de Johnston, ou bien l'olfaction grâce aux LA (Stocker, 1994). Les neurones récepteurs olfactifs (NRO), situés dans les antennes et les palpes maxillaires projettent leur axone au niveau des LA, composés d'une cinquantaine de glomérules. Des LA partent les NP, regroupés sous formes de tractus et projetant soit directement sur la corne latérale, soit vers les terminaisons dendritiques des CP.

Le tritocerebrum consiste en deux lobes relativement petits et bilatéraux à la base du cerveau. Ceux-ci jouxtent le ganglion sous-oesophagien (GSO). Les deux lobes sont reliés par un faisceau de fibres nerveuses appelées "commissure". La fonction principale du

tritocérébrum serait de contrôler les interactions entre le proboscis et le tube digestif, notamment via les nerfs stomato-gastriques.

Le ganglion sous-oesophagien est une structure qui bien que localisée dans la capsule céphalique, ne fait anatomiquement pas partie du cerveau. Elle est composée de deux ganglions symétriques proches du tritocérébrum. Le GSO reçoit des afférences en provenance des neurones récepteurs gustatifs (NRG) et est impliqué dans le traitement de l'information sensorielle gustative. Par contre, la nature et le rôle de ses projections vers les structures supérieures sont extrêmement mal connus (Vosshall and Stocker, 2007).

Nous allons maintenant nous focaliser sur les structures impliquées dans la mémoire associative olfactive.

IV.2 Le système olfactif de la drosophile

Le système olfactif de la drosophile comprend plusieurs étages, comme toute modalité sensorielle.

IV.2.1 Les neurones récepteurs olfactifs

Les molécules odorantes sont principalement des corps volatils qui peuvent entrer en contact avec la drosophile. C'est au niveau des sensilles des antennes, ainsi qu'au niveau des palpes maxillaires que s'effectue la fixation des molécules odorantes sur les neurones récepteurs olfactifs (NRO), au nombre de 1300. Ces neurones expriment des récepteurs olfactifs, dont il existe une soixantaine de types différents chez la drosophile, mais chacun n'en exprime en général qu'un seul type créant ainsi une organisation odeur-spécifique. Contrairement aux mammifères chez qui les récepteurs olfactifs sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), les récepteurs olfactifs de type OR (pour *olfactory receptor*) de drosophile sont des récepteurs ionotropiques hétéromériques (Sato et al., 2008) (Figure 25). Ces récepteurs de type OR, chez la drosophile, possèdent bien un site putatif de liaison aux protéines G mais il a été montré que celui-ci est extracellulaire (Benton et al., 2006), ce qui est inconciliable avec une fonction de RCPG. Outre son rôle dans l'adressage des récepteurs au niveau de l'épithélium sensoriel (Elmore et al., 2003; Larsson et al., 2004), le co-récepteur OR83b participe à l'hétéro-dimère formant le canal ionique permettant la dépolarisation puis la génération de potentiels d'action lors de la fixation de molécules odorantes sur le récepteur, puis la libération d'acétylcholine à la synapse (Benton, 2008).

Une deuxième classe de récepteur olfactif a récemment été caractérisée : il s'agit de récepteurs ionotropiques IR, apparentés aux récepteurs glutamatergiques ionotropiques, mais ne présentant pas les résidus permettant de lier le glutamate. Ils lient sélectivement des amines et des acides, et sont exprimés dans des NRO n'exprimant ni les OR ni les GR (Benton et al., 2009; Silbering et al., 2011).

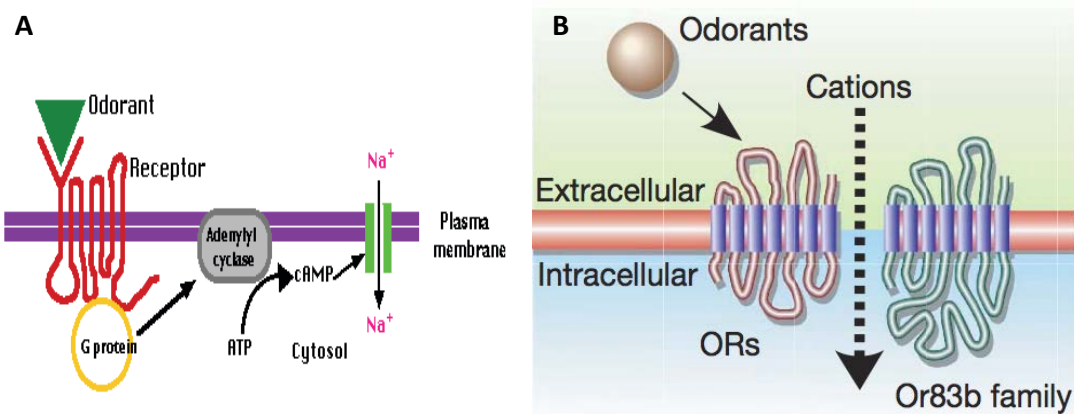


Figure 25 : Les récepteurs olfactifs d'insectes fonctionnent différemment de ceux des mammifères

Chez les mammifères, les RO sont des RCPG qui induisent une cascade de transduction consécutivement à la fixation d'une molécule odorante aboutissant à l'activation de canaux cationiques. (A). Mais il a été démontré que chez les insectes sont impliqués des courants cationiques directement médiés par les récepteurs et leurs co-récepteurs (B) (Sato et al., 2008).

Enfin, il convient de remarquer que certains NRO expriment des récepteurs de type gustatif (GR pour *Gustatory Receptor*) tels que Gr63F1, Gr21D1 et Gr10B1 (Dunipace et al., 2001; Scott et al., 2001).

IV.2.2 Les lobes antennaires

Les projections axonales des NRO exprimant le même récepteur olfactif convergent dans la même sous-région du Lobe antennaire (LA), appelé glomérule (Figure 26) (Jefferis et al., 2001; Vosshall et al., 2000). Une carte complète des projections a été générée pour 37 classes de NRO couvrant à peu près toutes les familles de récepteur olfactif (Couto et al., 2005; Fishilevich and Vosshall, 2005). Au total il y a environ 50 classes de NRO et chacun des glomérules reçoit les informations exclusivement d'une seule classe de NRO (Laisue et al., 1999). Il y a donc environ 50 glomérules. Les NRO sont cholinergiques et forment des

synapses avec plusieurs types de neurones: les neurones de projection (NP), cholinergiques et excitateurs; et les interneurons locaux, inhibiteurs (GABAergiques) ou excitateurs (cholinergiques) (Jefferis et al., 2001; Marin et al., 2002; Stocker et al., 1997). Les NP sont au nombre de 150 suggérant qu'il y en a 3 à 5 efférents de chaque glomérule (Vosshall et al., 2000). Ils constituent les seuls neurones apportant l'information olfactive aux structures supérieures que sont les CP et la CL (Figure 26).

L'activité glomérulaire en réponse aux odeurs présente la particularité d'être stéréotypée (Hallem et al., 2004): chaque odeur correspondant à un cocktail précis de molécules odorantes fondamentales, un patron d'activité spécifique est généré dans les LA.

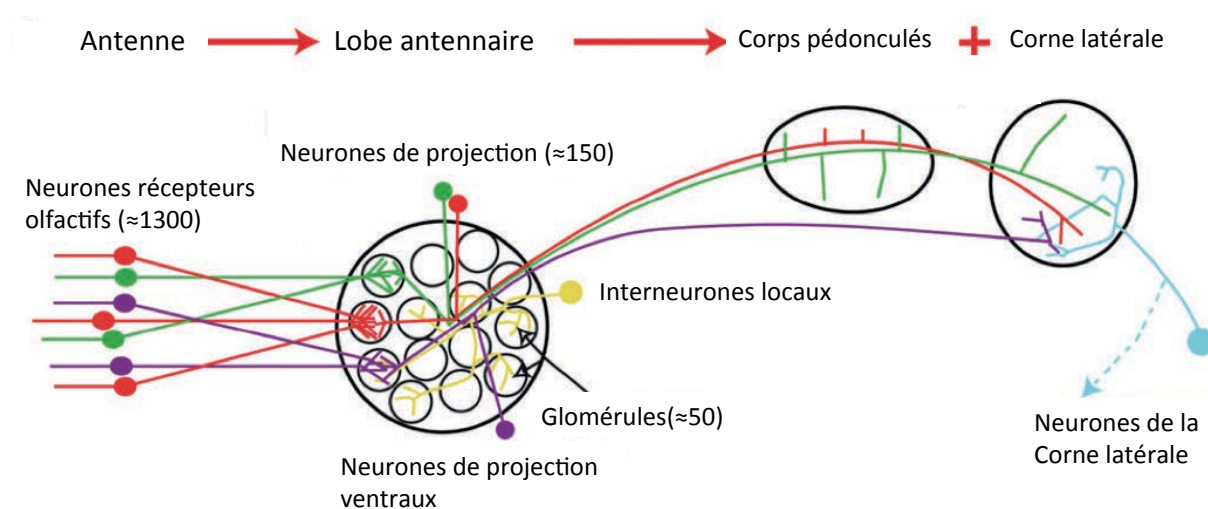


Figure 26 : Circuits neuronaux du traitement de l'information olfactive

Les NRO exprimant le même récepteur synapsent avec les interneurons locaux et les NP au niveau d'un même glomérule dans les LA. Les NP projettent leurs axones vers les deux centres secondaires du traitement olfactif : les CP et la CL (Jefferis et al., 2007).

IV.2.3 Des neurones de projection aux structures secondaires du traitement olfactif : la corne latérale et les corps pédonculés

En sortie des LA, les NP forment deux tractus différents : les tractus antenno-cérébraux interne (iACT) et médian (mACT) (Ito et al., 1998; Stocker et al., 1997). Les NP composant l'iACT font d'abord synapse au niveau des calices des CP, puis continuent jusqu'à la CL (Figure 27). Ceux du mACT qui sont issus des glomérules ventraux projettent uniquement au niveau de la CL Certains des neurones composant le mACT sont inhibiteurs et

reçoivent des afférences provenant de nombreux glomérules, pouvant ainsi être activés par un large spectre d'odeurs (Jefferis et al., 2007).

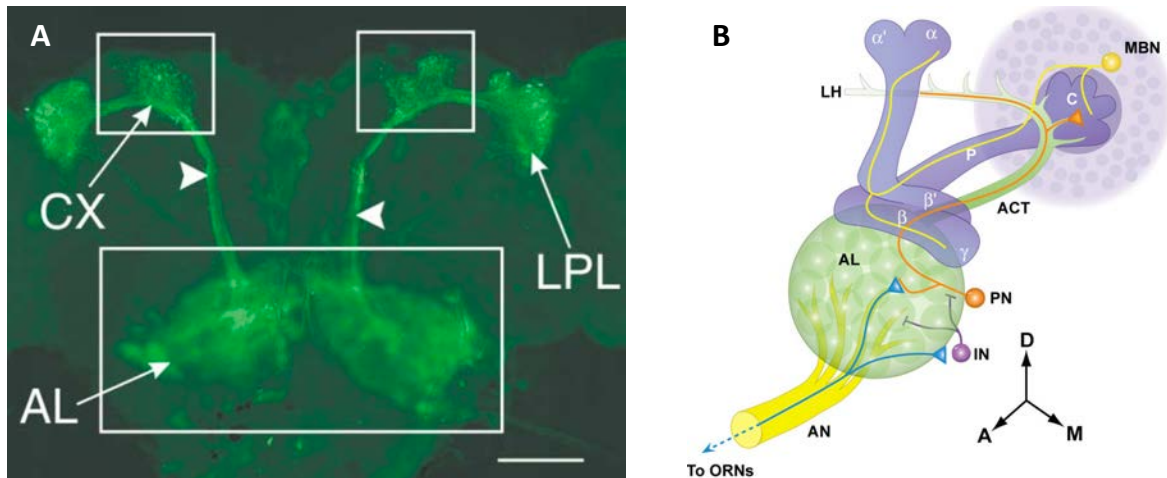


Figure 27 : Visualisation des neurones de projection et des régions innervées

Les dendrites des neurones de projection (PN) reçoivent l'information au niveau des glomérules des lobes antennaires (AL), et les axones font synapse au niveau des calices (CX/C) et de la corne la corne latérale (LPL ou Lateral Protocerebral Lobe/LH ou Lateral Horn) pour les NP du iACT, ou uniquement au niveau de la corne latérale pour ceux du mACT (A : immunohistochimie révélant les PN exprimant la GFP, (Fiala et al., 2002) ; B : schéma (Davis, 2011)).

Le codage de l'information garde un haut niveau de structure jusqu'au niveau de la corne latérale, puisque les NP issus d'un même glomérule y projettent ensemble (Jefferis et al., 2007). Les neurones de l'iACT et du mACT diffèrent par la topographie de leur projection sur la CL et le type d'information olfactive encodée : ceux du mACT projettent uniquement sur la zone ventrale de la CL, pour un traitement des phéromones, tandis que ceux du iACT projettent sur l'ensemble de la CL, dont la partie dorsale répond plus particulièrement aux odeurs de fruit (Jefferis et al., 2007).

Le fait que les NP contactent à la fois les CP et la CL suggère un traitement différent des informations olfactives selon la structure dans laquelle elles sont envoyées. Si le blocage des NP par la toxine tétanique TNT empêche la réponse innée aux odeurs aussi bien attractives qu'avérsives (Heimbeck et al., 2001), l'ablation des CP ne perturbe pas la réponse innée aux odeurs avérsives (de Belle and Heisenberg, 1994), alors que le blocage de la transmission synaptique de ces mêmes CP perturbe la réponse aux odeurs attractives (Wang et al., 2003). On peut donc penser à une implication de la CL pour les odeurs naturellement avérsives, et à l'implication des CP pour les odeurs attractives. La CL est envisagée comme

étant une voie de traitement inné des informations olfactives, contrairement aux CP qui peuvent, eux, intégrer en outre une dimension dépendante de l'expérience (Heimbeck et al., 2001).

Les NP contactent les Cellules de Kenyon (KC), neurones constituant les CP, au niveau de leur région dendritique, les calices (Lin et al., 2007; Tanaka et al., 2004). Les expériences de traçage anatomique montrent que chaque KC reçoit des afférences de combinaisons différentes et aléatoires de glomérules (Caron et al., 2013). Le hasard des afférences aux KC individuelles permet de maximiser la diversité de réponse des KC et permet aux CP de traiter tout un univers d'odeurs.

IV.3 Les Corps Pédonculés: Centre de la mémoire associative olfactive

IV.3.1 Description classique des Corps pédonculés

Les Corps Pédonculés (CP) sont un important neuropile retrouvé chez les annélides et tous les arthropodes, sauf les crustacés (Figure 28) (Strausfeld et al., 1998). Ils furent découverts en 1850 par Félix Dujardin qui en comparant cette structure parmi différentes espèces d'insectes émit l'hypothèse qu'il soutenaient une part de volonté propre de l'animal, par opposition à ses actions instinctives. Le rôle de cette structure dans la mémoire olfactive (appétitive) a par ailleurs été démontré en premier chez l'abeille *Apis mellifera* (Menzel et al. 1974; Erber et al. 1980) puis chez la drosophile (Heisenberg et al., 1985; Schwaerzel et al., 2003).



Figure 28 : Variation des Corps Pédonculés chez les insectes

CP primitifs dépourvus de calice chez le poisson d'argent Lepisma (A). CP avec calice unique chez le criquet Schistocerca (B). CP avec double calice chez l'abeille Apis mellifera (C). (cb) corps cellulaires (V,M) lobes verticaux et medians, respectivement (Strausfeld et al., 1998).

Les CP forment une structure bilatérale, ils sont séparés du reste du neuropile par une fine couche de cellules gliales. Chez la drosophile, on compte par hémisphère cérébral environ 2000 neurones intrinsèques, appelés Cellules de Kenyon (KC, pour *Kenyon Cells* en anglais), dont les corps cellulaires sont massés dans la partie dorsale postérieure du cerveau (Ito et al., 1997). Leurs dendrites sont regroupées dans une zone située juste en dessous des corps cellulaires, formant le calice (Figure 29). Les axones projettent dans la portion antérieure du cerveau via une structure dense appelée le pédoncule, donnant naissance à cinq lobes différents : deux lobes verticaux (α et α') et trois lobes horizontaux (γ , β et β'). Les CP sont divisés en trois types neuronaux en fonction des ramifications de leurs branches axonales (Crittenden et al., 1998) : les neurones α/β (au nombre approximatif de 990), α'/β' (environ 350 neurones) et γ (environ 675 neurones) (Aso et al., 2014a).

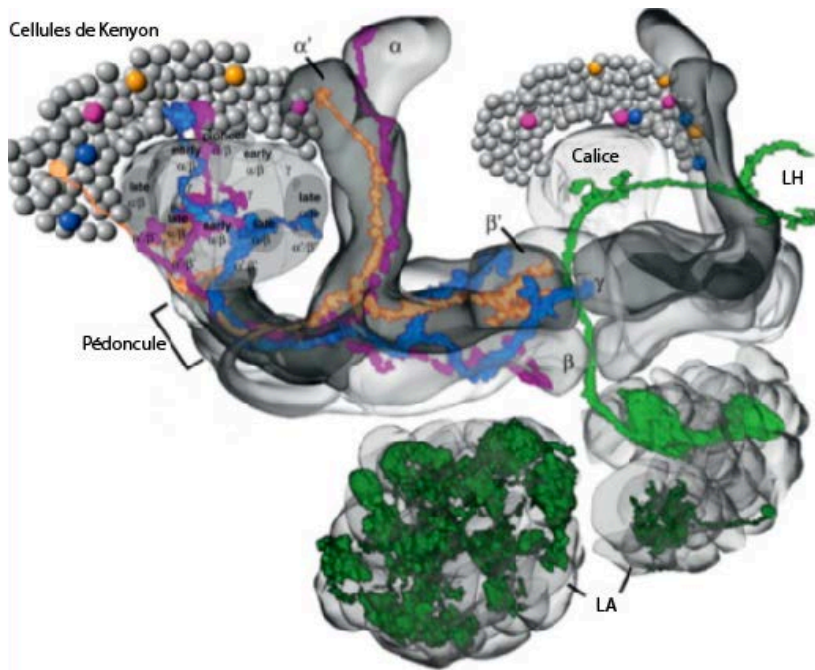


Figure 29 : Représentation schématique des Corps Pédonculés et de leurs afférences olfactives

Les neurones sensoriels olfactifs projettent sur les lobes antennaires (LA). De là, les neurones de projection (en vert) projettent via les tractus antenno-cérébraux et connectent les dendrites des CP localisés dans les calices, et également la corne latérale (LH, Lateral Horn). Chaque CP est composé d'environ 2000 neurones appelés Cellules de Kenyon. Trois types de Cellules de Kenyon projettent dans cinq lobes α/β , α'/β' , et γ (Dubnau and Chiang, 2013).

A l'extrémité antérieure du pédoncule, les axones des neurones α/β se séparent et forment deux branches de façon verticale et médiale, formant respectivement les lobes α et β . Il en est de même pour les neurones α'/β' , dont les axones forment les lobes α' et β' (Crittenden et al., 1998). Par contre, les neurones γ ont chez l'adulte des projections axonales uniquement médiales qui constituent le lobe γ . Récemment la population des neurones α/β a été divisée en trois sous-classes, selon des critères anatomiques et développementaux. Ainsi, on distingue les neurones au centre des lobes α/β formant le 'cœur' (environ 400 neurones α/β_c), les neurones postérieurs (environ 90 neurones α/β_p) qui ne sont pas reliés directement aux LA, et les neurones α/β de surface (environ 500 neurones α/β_s) (Aso et al., 2014a).

L'importance des CP dans les processus d'apprentissage associatif appétitif avait d'abord été démontrée chez l'abeille par des expériences d'anesthésie des CP (Erber et al. 1980). Chez la drosophile leur implication dans la mémoire associative aversive a été démontrée plus tard via l'utilisation de mutants générant des anomalies structurales des CP

tels que *mbm* (*mushroom body miniature*) et *mbd* (*mushroom body degenerated*) (Heisenberg et al. 1985). De plus l'ablation totale des CP par voie chimique (ingestion d'hydroxyurée durant le premier stade larvaire) induisait également un fort défaut d'apprentissage tout en laissant intactes les capacités olfactives et la réactivité aux chocs électriques (de Belle and Heisenberg, 1994). Puis en 2003, l'implication des CP dans la mémoire appétitive fut démontrée pour la première fois chez la drosophile (Schwaerzel et al., 2003).

Vue la place centrale des CP dans l'apprentissage et la mémoire, la question du neurotransmetteur employé par les cellules de Kenyon est un enjeu important. Cependant, en dépit des efforts réalisés, aucune réponse définitive n'a pu être apportée, aucun des neurotransmetteurs classiques ne semblant être utilisé par les CP. Hormis l'exception de l'immunoréactivité glutamatergique transitoire observée dans les neurones α/β c chez des individus juste éclos (Sinakevitch et al., 2010), d'autres possibilités ont été soulevées. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence la présence du neuropeptide sNPF (short NeuroPeptide F) dans une grande partie des CPs. La présence du peptide sNPF n'a pas été détectée dans les neurones du core, au centre du pédoncule et des lobes α' et β' (Johard et al., 2008). Par ailleurs, les travaux de Strausfeld et al., 2001 ont montré que la taurine est préférentiellement exprimée dans les neurones α'/β' et l'aspartate dans les neurones α/β . Enfin, l'identification d'un nouveau type de transporteur vésiculaire, PRT, par l'équipe de David Krantz pourrait confirmer l'hypothèse que les KC utilisent un neurotransmetteur encore non-décrit (Brooks et al., 2011). Le neuro-transporteur putatif PRT est structurellement apparenté aux transporteurs de monoamines et à ceux de l'acétylcholine. De façon intéressante, le mutant *pri* présente un défaut de mémoire aversive.

IV.3.2 Apport du système Split-Gal4 pour la caractérisation des Cellules de Kenyon

Le système Split-Gal4, amélioré chez Gerald Rubin à Janelia Farm research Campus (Pfeiffer et al., 2010) a été utilisé à grande échelle dans ce même laboratoire pour explorer plus en détail l'anatomie des Corps Pédonculés (Aso et al., 2014).

En criblant plus de 7000 constructions Split-Gal4, Aso et al. ont pu améliorer la description des Cellules de Kenyon, en arrivant à la distinction de 7 types cellulaires (Figure 30). Le lobe γ se divise désormais en deux strates, principale et dorsale, les lobes α'/β' en strates médiane et antéro-postérieure et les lobes α/β en strates postérieure, cœur et surface.

Cinq de ces 7 types ont leurs dendrites dans le calice principal, tandis que les γd and $\alpha/\beta p$ les ont dans les calices accessoires.

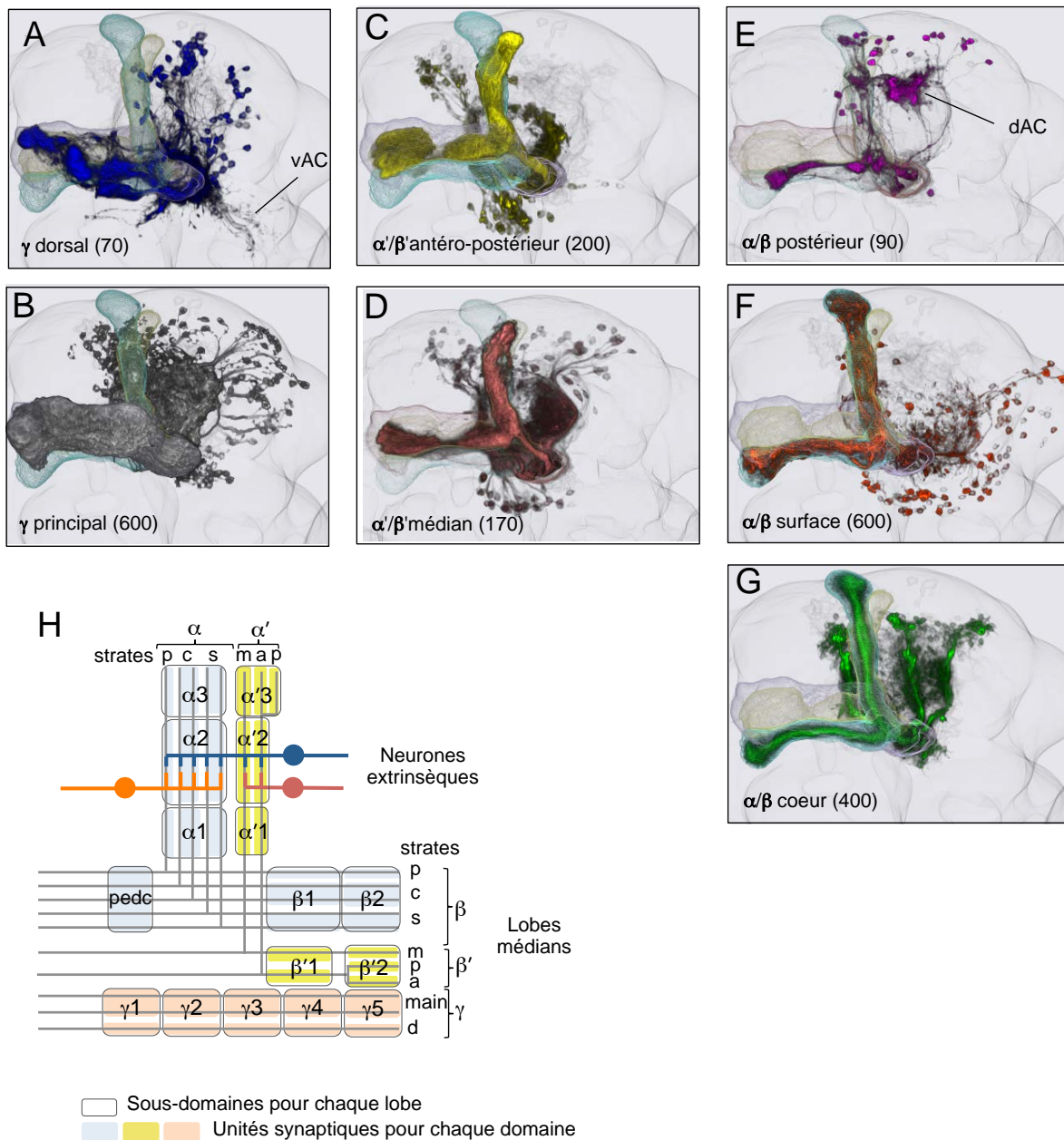


Figure 30 : Description améliorée des Cellules de Kenyon

(A) à (G) : Les différents sous-types KC, et le nombre de cellules que comprend chaque population (Aso et al., 2014).

(H) : Selon le patron d'innervation des lobes par les neurones dopaminergiques, on peut virtuellement séparer chacun des lobes en 5 sous-régions (Aso et al., 2014).

IV.4 Neurones extrinsèques aux corps pédonculés

Si beaucoup d'attention a été portée aux CP eux-mêmes, de nombreux neurones tout aussi cruciaux les accompagnent : on les appelle les neurones extrinsèques (par opposition aux neurones intrinsèques aux CP que sont les cellules de Kenyon). Ils peuvent être afférents, comme les NP, efférents, voire les deux à la fois.

IV.4.1 Afférences aux corps pédonculés

Parmi ces neurones afférents, les plus importants par leur nombre sont les neurones dopaminergiques, au nombre de 280 environ (Mao and Davis, 2009). Les neurones dopaminergiques (ND) innervent l'ensemble des CP, mais de manière spatialement ségréguée. Ainsi un type neuronal donné innerve une région restreinte des CP, mais tous les lobes présents dans cette région (α , α' pour une projection sur un lobe vertical et β , β' et γ pour un lobe médian) sont couverts par des afférences dopaminergiques. D'autre part, la partie antérieure du pédoncule et les calices sont également couverts par des afférences dopaminergiques (Figure 31) (Aso et al., 2010; Mao and Davis, 2009; Tanaka et al., 2008).

Différents groupes de ND ont ainsi pu être définis et pour certains une fonction physiologique a pu être suggérée. Parmi l'important groupe PAM ('Paired Anterior Medial', ceci indiquant la position de leur corps cellulaire, d'environ 100 neurones par hémisphère), les ND M3 ont pu être impliqués dans la transmission de l'information nociceptive dans le cas d'une mémoire labile (Aso et al., 2010), tandis que d'autres neurones de PAM véhiculent eux une information de récompense participant à la formation de mémoire appétitive (Liu et al., 2012). Le groupe PPL1 ('Paired Posterior Lateral 1', avec 12 neurones par hémisphère) contient en particulier les neurones MV1 et MP1, dont l'activité contrôle la formation de la MLT aversive, postérieurement à l'association SC+/SI (Plaçais and Preat, 2013). Le neurone MP1 participerait en particulier à coder le statut énergétique de la drosophile tant pour la mémoire aversive que pour la mémoire appétitive (Musso et al., 2015).

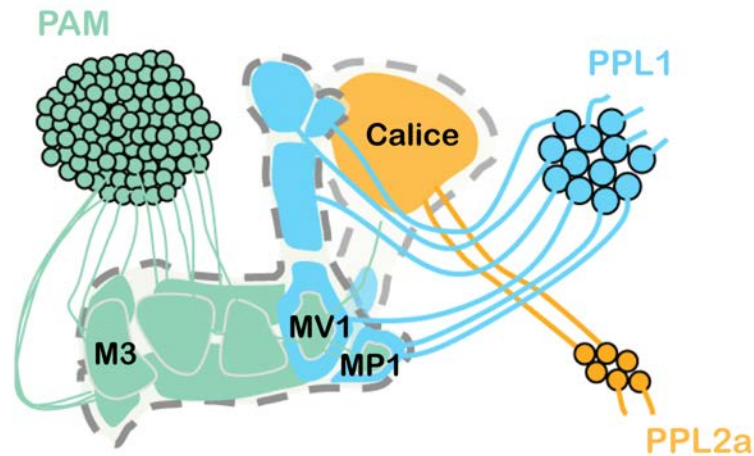


Figure 31 : Afférences dopaminergiques aux Corps Pédonculés

Représentation schématique des afférences dopaminergiques sur les CP. Les neurones du groupe PPL1 (bleu) projettent sur les lobes verticaux des CP : sur ce schéma les neurones MPI projettent sur le talon et au niveau du pédoncule. Les neurones MVI projettent sur la partie basse de lobes verticaux et la zone de jonction. Au moins deux neurones du groupe PPL2ab innervent le calice (Jaune). Le groupe des PAM innervent les lobes médians, la description anatomique de ce groupe est moins détaillée que pour PPL1, excepté les neurones M3, projetant à l'extrémité des lobes médians (Aso et al., 2012).

D'autres afférences aux CP sont les neurones octopaminergiques (NOA). Certains NOA ont longtemps été considérés comme responsables de la transmission du SI appétitif (information sucrée), en raison de leur contact avec le Ganglion Sub-Oesophagien (relayant les informations gustatives) et de l'implication de l'enzyme T β h (de la voie de synthèse de l'octopamine) (Schwaerzel et al., 2003) et du récepteur à l'octopamine, dans les CP, pour la mémoire appétitive (Kim et al., 2013). Depuis, il a été montré que certains NOA impliqués dans la mémoire appétitive contactent en fait des neurones dopaminergiques PAM (Burke et al., 2012). Récemment, l'ensemble des NOA afférents aux CP, a été caractérisé anatomiquement (Aso et al., 2014).

IV.5 Modèle intégratif

Ainsi, les CP sont au carrefour des voies sensorielles olfactive, nociceptive et appétitive. Ils sont donc logiquement le lieu de l'intégration de la coïncidence de deux stimuli, olfactif et aversif ou olfactif et appétitif.

Au sein de la population de KC, chacune présente un codage combinatoire de molécules odorantes lui permettant de représenter une composition odorante unique. Par contre, la convergence d'un grand nombre de KC sur un petit nombre de neurones efférents (21 types cellulaires différents) montre que la dimension de codage au niveau de ces derniers est bien plus réduite (21 au maximum). Les neurones efférents pourraient coder plutôt des « variables d'état », telles que « virage », « locomotion », « sommeil » qui établissent collectivement une réponse comportementale aux stimuli olfactifs. Leur activité pourrait refléter une valence, relativement à ces variables d'état (Aso et al., 2014).

Lors de l'apprentissage, la coïncidence du SC+ et du SI est détectée au moins dans les CP où l'adénylate cyclase rutabaga intervient, son activation nécessitant un signal métabotrope issu de la fixation de la dopamine sur ses récepteurs et un signal calcique provenant de l'activité électrique consécutive à l'arrivée de l'information olfactive (Figure 32). Des changements physiologiques doivent être en mesure de modifier la fonction de transfert des quelques KC activées par le SC+. L'hypothèse la plus vraisemblable est que ce soit la synapse entre les KC impliquées et les neurones efférents qui subisse une plasticité, et ce par des changements physiologiques et structurels dépendant en partie de néo-synthèse protéique (dans le cas de la MLT) ou non (pour les autres formes de mémoire).

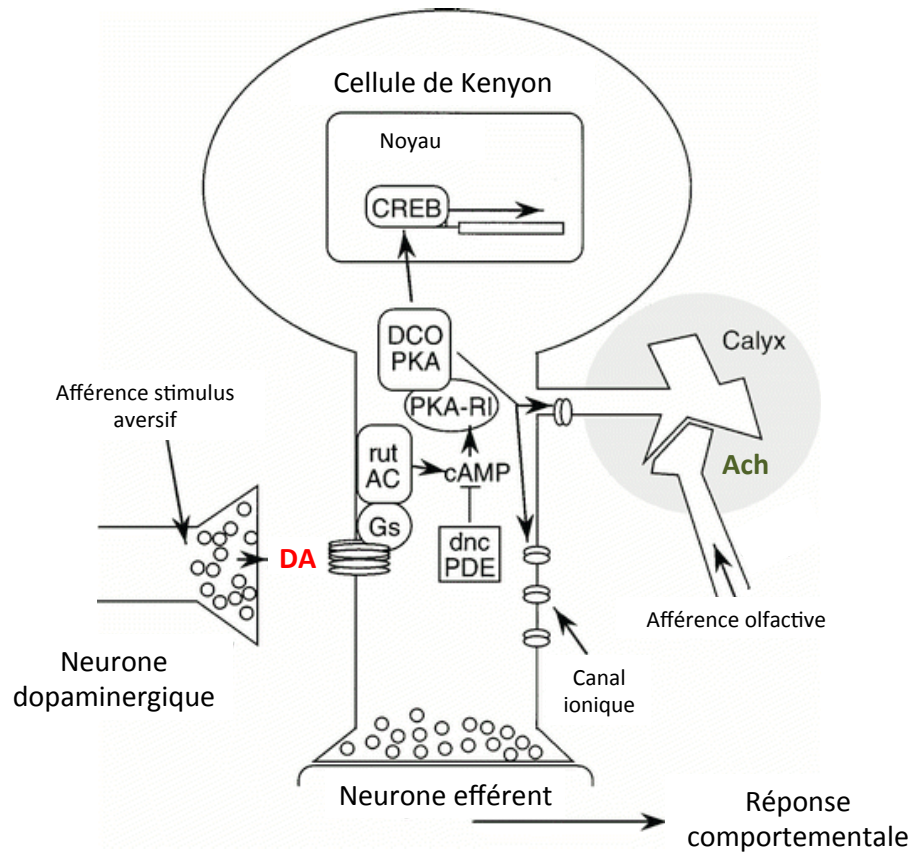


Figure 32 : Détection de coïncidence des stimuli conditionné et inconditionné

Les neurones de projection, cholinergiques convoient l'information olfactive, et contactent les KC au niveau des calices. Des neurones dopaminergiques convoient l'information nociceptive (ou appétitive). Suite à l'activation des récepteurs dopaminergiques métabotropiques, la protéine Gs, peut activer l'adénylate cyclase (AC) rutabaga, si dans le même temps (ou légèrement avant) celle-ci a été potentialisée par la fixation de Ca^{2+} provenant de l'activité électrique postérieure à l'arrivée de l'information olfactive. L'AC va alors catalyser la production d'AMPC, messenger intracellulaire majeur qui pourra avoir des conséquences directes sur la physiologie du neurone ou passant par l'activation de l'expression génétique (adapté de Waddell and Quinn, 2001).

Au niveau des KC, on assiste donc à trois étapes successives : l'apprentissage où la détection de coïncidence initie des cascades moléculaires ; la consolidation, période de repos pendant laquelle les cascades moléculaires induisent des modifications synaptiques plus ou moins durables ; le rappel où la réactivation des KC spécifiques de l'odeur induit une réponse dans les neurones efférents, réponse fonction de la plasticité synaptique ayant eu lieu entre les neurones.

V. Liens dynamiques entre les différentes formes de mémoire

V.1. Dynamique des formes de mémoires aversives

V.1.2 Interdépendance de la MMT et de la MLT

Les modèles de la consolidation mnésique ont longtemps reposé sur l'hypothèse que la MLT était consolidée à partir de la trace mnésique encodant la MMT, elle-même dérivant de la MCT (Figure 33).

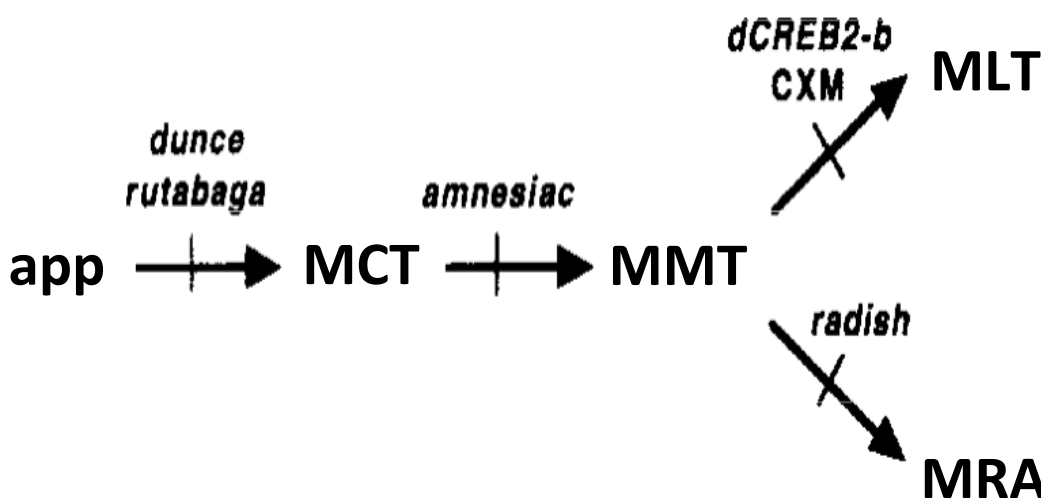


Figure 33 : Ancien modèle du lien entre les formes de mémoire aversive

Selon la conception encore récemment acceptée des interrelations entre les formes de mémoire, l'apprentissage menait à la formation de mémoire immédiate (MCT, via l'intervention de dunce et rutabaga. La MCT conduisait à la MMT grâce à amnesiac. Puis la MMT donnait lieu à la formation de MLT, au travers de l'activation de dCREB2 et de la synthèse protéique, et également à la formation de MRA, dépendante du gène radish. (adapté de Tully et al., 1994)

Cette question a été abordée chez la drosophile par Blum et al., 2009. Les individus mutants pour l'adénylate cyclase *rutabaga* (*rut²⁰⁸⁰*) présentent une MMT et une MLT quasi nulle. Cependant, par approche de sauvetage fonctionnel, les auteurs ont pu montrer que *rutabaga* était nécessaire dans les lobes γ seulement pour la MCT et la MMT et dans les lobes α/β seulement pour la MLT. Ceci suggère donc que la MLT se forme indépendamment des MMT et MCT.

V.1.2 La MLT et la MRA suivent deux voies parallèles et antagonistes

En contexte mutant pour *rutabaga*, la mémoire à 2 heures n'est pas complètement abolie et elle est au même niveau que les drosophiles sauvages après le traitement par le froid (Figure 34) (Isabel et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc que chez les mutants de *rut* la MRA à 2 heures est intacte alors que la MMT est affectée. Ainsi, la formation de la MRA serait indépendante de la MMT et de la voie *rutabaga* (Folkers et al., 1993; Isabel et al., 2004; Scheunemann et al., 2013).

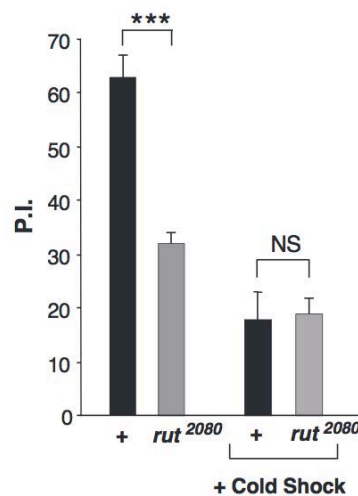


Figure 34 : MMT et MRA n'ont pas les mêmes exigences moléculaires

Après un cycle de conditionnement, la portion labile de la mémoire à 2h (MMT) est absente chez le mutant rut^{2080} , tandis la composante MT-ARM ne l'est pas. Seule la MMT dépend donc de rutabaga (scores en %) (Isabel et al., 2004).

Ces résultats ont conduit à postuler l'existence de deux voies d'apprentissage parallèles (Figure 35) :

- Une première voie AMPc- et *rutabaga*-dépendante pour la formation de la MCT, MMT et MLT.
- Une deuxième voie *rutabaga*-indépendante pour la formation de la MRA.

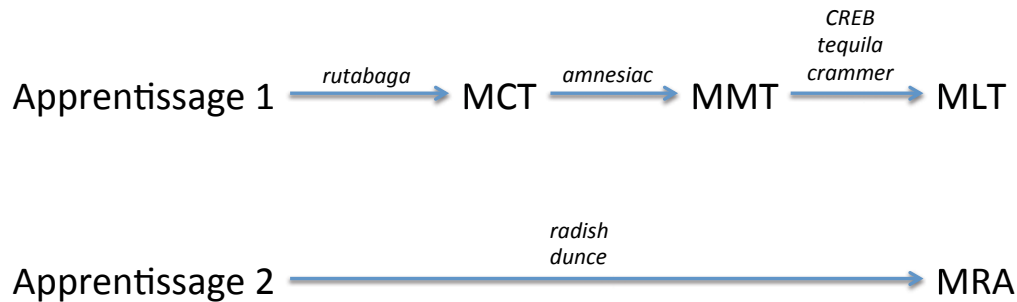


Figure 35 : Modèle des formes de mémoire parallèles

*La voie 1 dépend du gène *rutabaga* pour l'apprentissage initial, du gène *amnesiac* pour la formation de MMT, ainsi que des gènes *CREB*, *tequila* et *crammer* pour la consolidation de la MMT en MLT. La voie 2, elle, dépend des gènes *radish* et *dunce* pour la formation de la MRA.*

En outre, plusieurs points montrent que ces deux voies sont catégoriquement exclusives et antagonistes. D'une part, rappelons que le conditionnement massé ne forme pas de MLT d'après les expériences utilisant la CXM. Ensuite, réciproquement, des expériences utilisant un inhibiteur de la synthèse de sérotonine (dl-p-chloro-phenylalanine, pCPA) ont montré que cette molécule affectant la formation de MRA n'a aucun impact sur la formation de MLT (Figure 36 A). Par ailleurs, le traitement CXM, qui n'affecte pas la MRA, et les mutations affectant la MLT spécifiquement peuvent être combinées pour abolir complètement la mémoire à 24 heures après un conditionnement espacé (Figure 36 B). Enfin, chez le mutant *ala* (où une malformation des CP conduit à l'absence de lobes verticaux), alors que la LT-ARM est normale après un conditionnement simple, la mémoire formée après conditionnement espacé décroît plus rapidement pour donner un score de MLT nul (Figure 36 C). Ainsi la mémoire à 24 heures produite chez des drosophiles sauvages après un conditionnement espacé ne contient pas de MRA : elle serait activement effacée.

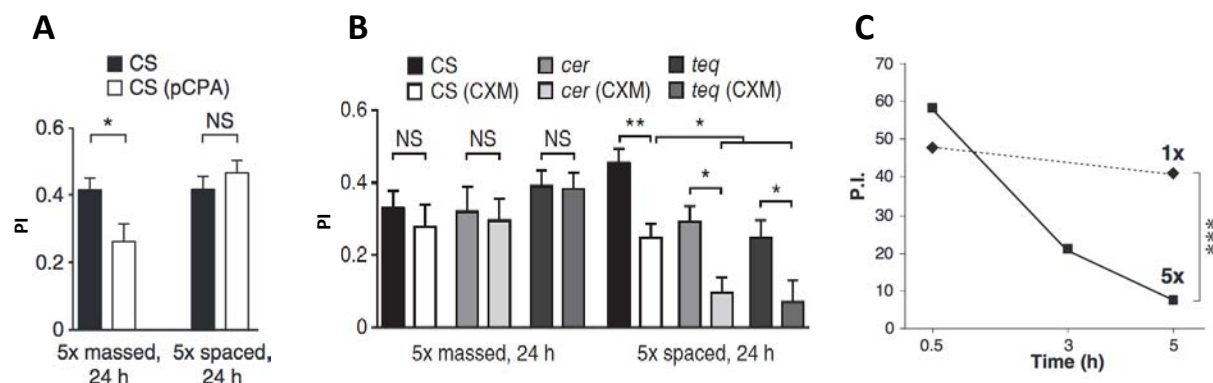


Figure 36 : Exclusivité et antagonisme de la MLT et de la MRA

(A) Le traitement par la pCPA affecte la MRA, mais pas la MLT (Plaçais et al., 2012).

(B) *cer* et *teq* sont des mutants de MLT, mais pas de MRA. Le traitement par la CXM affecte uniquement la MLT chez les drosophiles sauvages. On remarque que la CXM aggrave le phénotype de *cer* et *teq*, tombant à zéro. Cela montre qu'il n'y a aucune MRA formée après conditionnement espacé (Plaçais et al., 2012).

(C) Chez le mutant *ala*, la mémoire décroît plus rapidement après conditionnement espacé qu'après conditionnement simple, suggérant un effacement actif de la MRA (scores en %) (Isabel et al., 2004).

Enfin, dans l'article Plaçais et al., (2012) auquel j'ai participé, nous avons mis en évidence les mécanismes et les réseaux neuronaux sous-jacents à l'antagonisme entre les voies de formation de la MLT et de la MRA. Ils dépendent de deux paires de neurones dopaminergiques appartenant au groupe PPL1 : MP1 et MV1. Nous avons montré que l'inhibition de la MLT se fait quand la neurotransmission de ces neurones est bloquée pendant les intervalles de repos entre chaque cycle de conditionnement espacé (Plaçais et al., 2012). Par des expériences d'imagerie calcique *in vivo* sur ces neurones, il a été mis en évidence un phénomène synchronisé d'oscillations calciques dans ces deux paires de neurones. Ces oscillations sont renforcées (amplitude, fréquence et régularité) après un conditionnement espacé et affaiblies après conditionnement massé. La solidité de la corrélation nous a conduit à postuler que c'est l'activité rythmique des neurones dopaminergiques qui génère l'inhibition de la MRA (Figure 37).

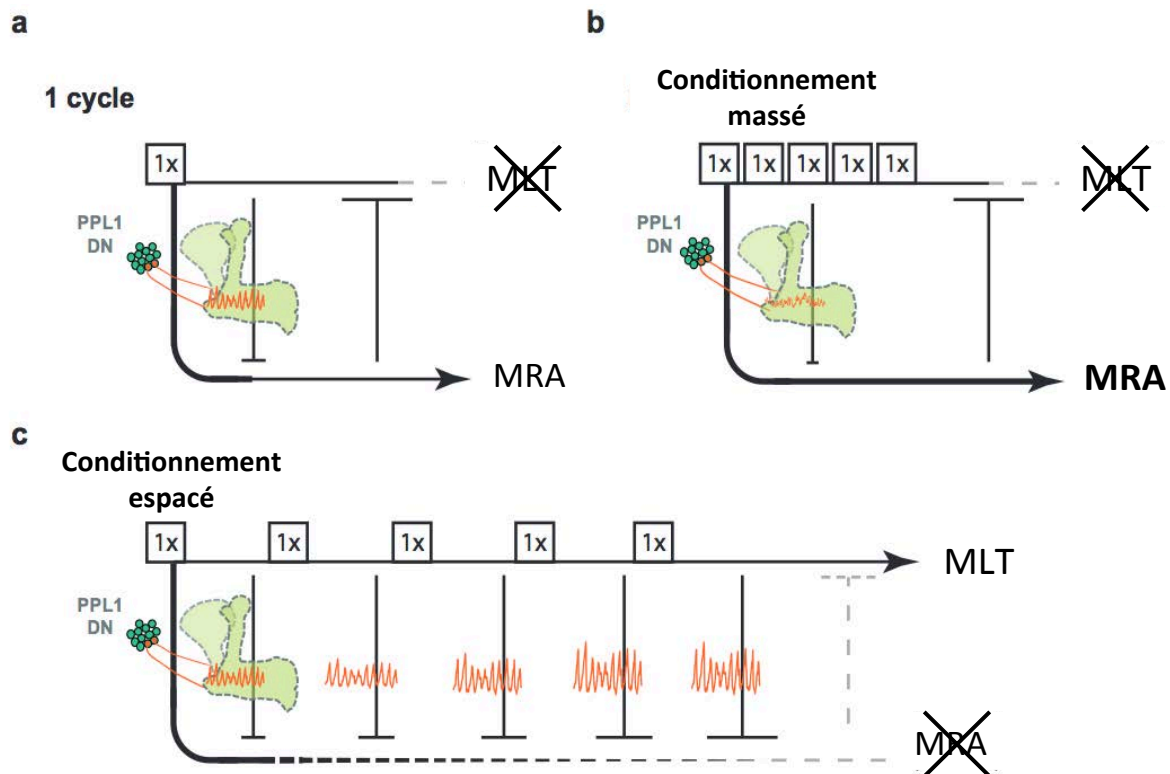


Figure 37 : Mécanisme proposé de l'antagonisme MLT-MRA

Les trois schémas illustrent le rôle des neurones dopaminergiques oscillants après un cycle de conditionnement (a), un protocole massé (b) et un protocole espacé (c) et leur effet sur les voies de formation de la MRA et MLT. a) Après un cycle de conditionnement, de légères oscillations des MP1 et MVI ne sont pas suffisantes pour empêcher la formation de MRA, qui en retour inhibe la formation de MLT. b) Un protocole massé réduit l'activité des MP1 et MVI autorisant une formation robuste de MRA, et par là même une inhibition de la MLT. c) Les oscillations des MVI et MP1 entre les cycles de conditionnement inhibent enfin la voie de formation de la MRA, permettant d'engager la formation de la MLT (Plaçais et al., 2012).

Ces résultats confortent et complètent le modèle d'exclusivité des mémoires consolidées aversives proposé précédemment (Isabel et al., 2004) et clarifie les mécanismes et les réseaux neuronaux sous-tendant l'antagonisme de la MRA et de la MLT.

V.1.3 La formation de la MLT est soumise à une plasticité adaptative en période de jeûne

Il existe une situation où un conditionnement espacé ne conduit pas à la formation de MLT : il s'agit du cas où les drosophiles ont été en état de jeûne prolongé (Plaçais and Preat, 2013). Il a été démontré qu'il se produit une inhibition de la MLT reposant sur le mécanisme de contrôle exposé ci-dessus. En effet, les oscillations des neurones dopaminergiques MP1 et

MV1 autorisant la formation de MLT ne sont plus observables si les drosophiles sont maintenues à jeun avant et après le conditionnement, conduisant à l'absence de MLT (Figure 38 (A)). De façon intéressante, une activation artificielle de ces neurones permet de rétablir la formation de la MLT, mais au prix d'une durée de vie réduite (Figure 38 (B)). Ainsi le mécanisme de contrôle de la MLT par les neurones dopaminergiques pourrait servir une fonction adaptative, en empêchant l'engagement dans des processus cérébraux coûteux lors d'une situation de détresse nutritionnelle.

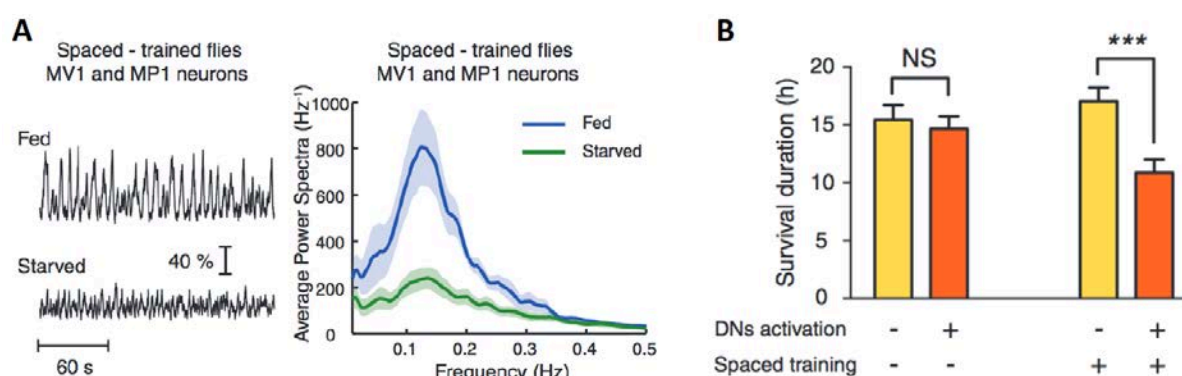


Figure 38 : La disponibilité énergétique dicte la formation de la MLT via les neurones dopaminergiques

(A) Les neurones dopaminergiques MP1 et MV1 codent la disponibilité énergétique : leur activité peut être rythmique chez des drosophiles à satiété pour autoriser la formation de MLT et drastiquement réduite chez des drosophiles à jeun.

(B) Chez des drosophiles à jeun (ne formant normalement pas de MLT), l'activation artificielle des neurones dopaminergiques, forçant la formation de MLT, va réduire la durée de vie des drosophiles (Plaçais and Preat, 2013).

V.2 Dynamique des formes de mémoires appétitives

V.2.1 Effets distincts du goût sucré et de la valeur énergétique lors de la formation de la mémoire appétitive

La formation de mémoire appétitive dépend de deux paramètres, au niveau de la récompense sucrée : le goût sucré et la valeur calorique. Si le sucrose couramment utilisé est à la fois sucré et nutritif, ces deux paramètres peuvent être dissociés avec d'autres sucres. Certains, comme l'arabinose ne sont que sucrés. Inversement le sorbitol n'est pas sucré mais a une valeur nutritive. Le type de mémoire appétitive formé dépend directement de ces deux

propriétés (Burke and Waddell, 2011). Un conditionnement appétitif avec un sucre uniquement sucré mais non calorique permet la formation de MCT/MMT, mais pas de MLT. La MLT ne se forme que lorsque le sucre a une valeur nutritive (Burke and Waddell, 2011). Des travaux de notre équipe (Musso et al., 2015) viennent de démontrer que la caractéristique valeur nutritive permettant d'engager la formation de MLT passe par des mécanismes de post-ingestion. De façon, remarquable, ce sont les neurones dopaminergiques MP1 autorisent la consolidation de la MLT appétitive : quand ils sont bloqués, la MLT est altérée (Figure 39 A), et quand on les active artificiellement après conditionnement sur un sucre non énergétique, on induit artificiellement la formation de MLT (Figure 39 B) Comme pour l'aiguillage vers la MLT aversive, cette implication des neurones MP1 est associée à un renforcement de leur activité oscillante (Figure 39 C).

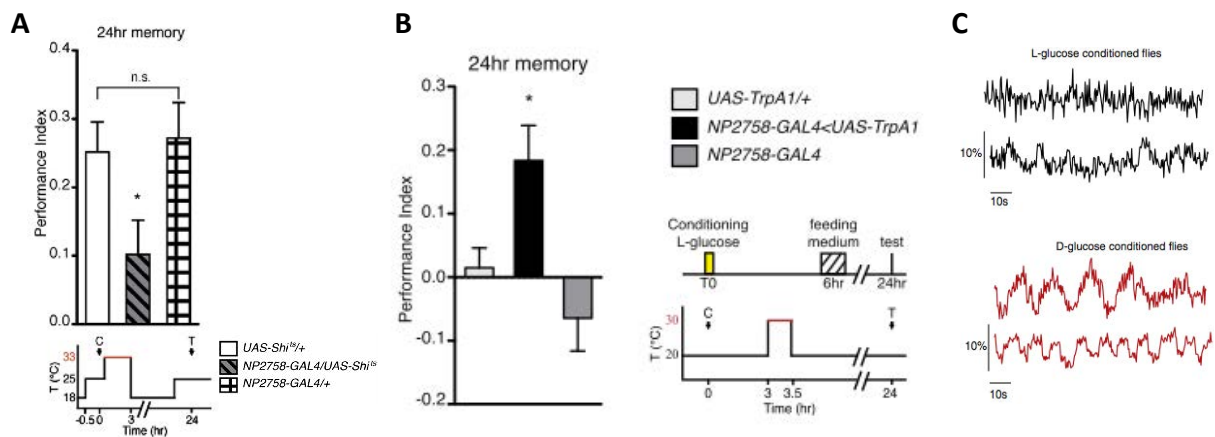


Figure 39 : Les neurones dopaminergiques MP1 contrôlent la formation de MLT appétitive

Le blocage des neurones MP1 après le conditionnement appétitif réduit significativement la MLT (A). L'activation des neurones MP1 après un conditionnement sur du L-glucose (sucre non énergétique) permet de générer de la MLT (B). Les neurones MP1 présentent une activité oscillante plus marquée après conditionnement sur un sucre énergétique que sur un sucre non-énergétique (C) (Musso et al., 2015).

V.2.2 Les MCT/MMT et la MLT appétitives sont indépendantes

La question du lien séquentiel entre la MCT, la MMT et la MLT s'est également posée dans le cadre de la mémoire appétitive. Et elle se pose d'autant plus qu'en appétitif, un même protocole de conditionnement induit aussi bien la MCT, la MMT que la MLT. Les travaux de Trannoy et al., 2011 au laboratoire ont montré que la MCT et la MMT nécessitent l'AC *rutabaga* uniquement dans les KC γ pour être formées, et leur rappel dépend uniquement des

KC γ . A l'inverse, la MLT appétitive requiert *rutabaga* uniquement dans les α/β pour être formée, et son rappel se fait depuis les KC α/β seules. La MLT appétitive est donc indépendante des MCT et MMT appétitives.

V.3 Spécificités du rappel mnésique en terme de population de Cellules de Kenyon

Il est maintenant bien établi que la mémoire associative olfactive est stockée dans les CP. Mais il se pose une question fondamentale concernant le rappel des informations stockées : comment l'information est-elle remobilisée ? Le rappel est-il un phénomène commun aux différentes formes de mémoires ou bien met-il en jeu des réseaux spécifiques ? Peut-on établir une carte des réseaux relativement aux différentes phases de mémoire précédemment décrites ?

V.3.1 Mémoire aversive

Le rappel de la MCT, de la ST-ARM, de la MMT et de la MT-ARM

De nombreuses études ont porté sur l'effet d'un blocage spécifique de la transmission synaptique des CP lors de la restitution de la mémoire. Globalement, les données s'accordent sur le rôle de restitution des neurones α/β dans le rappel de la mémoire immédiate et à 3 heures. Les données s'accordent aussi sur l'implication des neurones γ dans la restitution de la mémoire à 3 heures mais leur implication dans la mémoire immédiate reste controversée (Cervantes-Sandoval et al., 2013; Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001; Schwaerzel et al., 2002).

Les récents travaux d'Emna Bouzaiane dans notre équipe ont levé la plupart des inconnues à ce niveau. Selon la classification décrite en IV.1.1, pour les mémoires observées à 5 minutes, la MCT dépend d'une efférence des lobes γ tandis que la ST-ARM (sa contrepartie résistante à l'anesthésie) dépend elle d'une efférence des lobes α/β . En ce qui concerne les mémoires à 3 heures, on assiste à une inversion des exigences en terme de population de KC : la MMT dépend d'une efférence des lobes α/β , tandis la MT-ARM (sa contrepartie résistante à l'anesthésie) dépend d'une efférence des lobes γ (Figure 40).

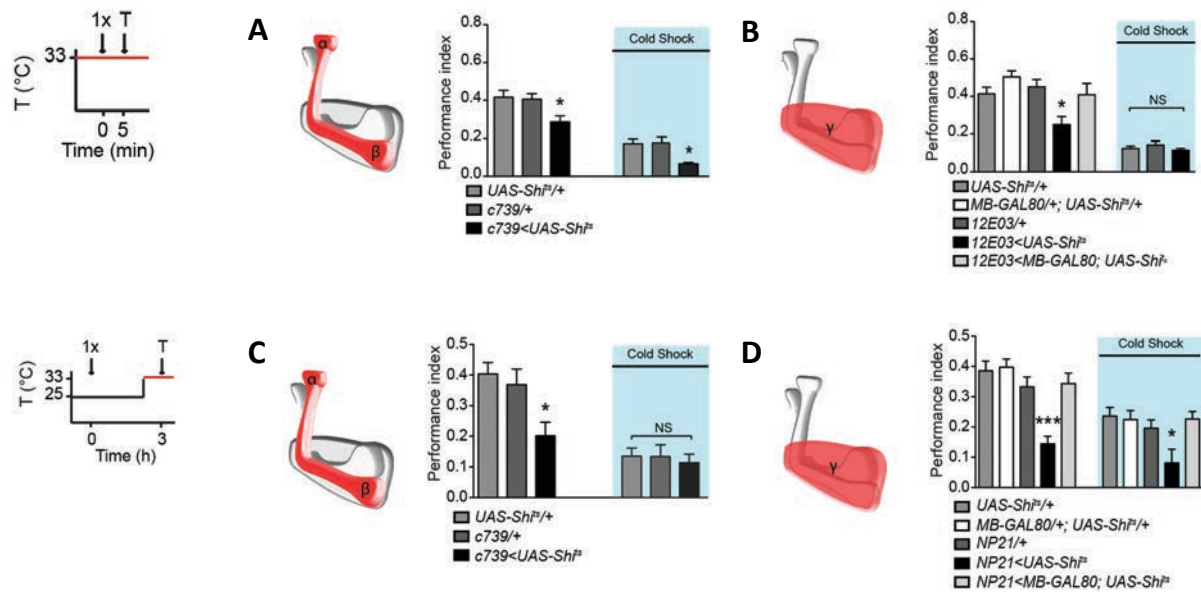


Figure 40 : Implication des populations de KC pour le rappel des mémoires immédiates et à 3 heures

Pour la mémoire à 5min, le blocage de la neurotransmission des KC α/β affecte spécifiquement la part de mémoire résistante à l'anesthésie (A), tandis que celui des KC γ affecte spécifiquement la part labile (B).

Pour la mémoire à 3h, réciproquement, bloquer les KC α/β altère la mémoire labile (C) et les γ la part résistante à l'anesthésie (D). (Bouzaiane et al., 2015)

Le rappel de la MLT et de la LT-ARM

Les expériences de blocage de la transmission synaptique ont également depuis plusieurs années eu a cœur d'identifier les populations de KC requises pour le rappel des mémoires consolidées. Ainsi, pour la MLT, la neurotransmission des neurones α/β est requise lors du test alors que le blocage des neurones γ n'a aucun effet (Figure 41 (A)) (Isabel et al., 2004). Plus récemment, ce résultat a été affiné, et il apparaît que la neurotransmission des neurones α/β de surface et postérieurs est plus précisément requise, mais que les neurones α/β cœur ne sont pas requis (Huang et al., 2013).

En ce qui concerne la LT-ARM, les travaux d'Emna Bouzaiane dans l'équipe ont également montré que contrairement à la MLT, cette forme de MRA repose sur une efférence des lobes α'/β' , mais pas des α/β , ni des γ (Figure 41 (B)).

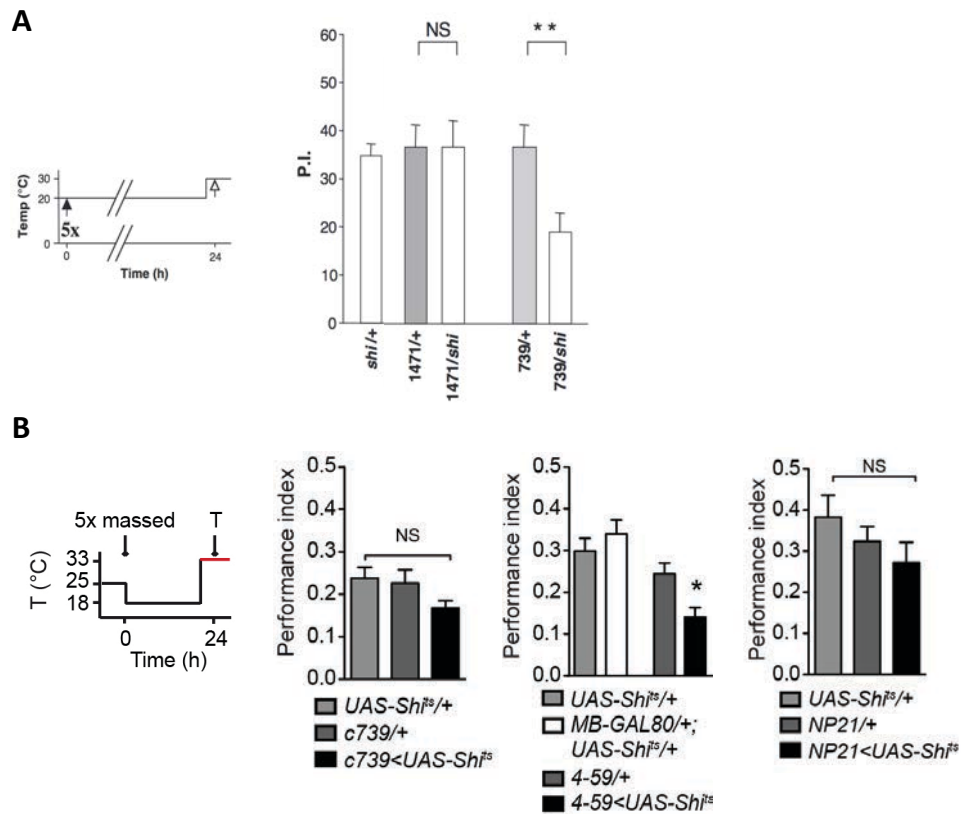


Figure 41 : MLT et LT-ARM ne dépendent pas des mêmes efférences des KC lors du rappel mnésique

(A) La MLT est affectée quand on bloque l'efférence des lobes α/β (pilote d'expression *c739*) mais pas depuis les lobes γ (pilote d'expression *1471*) (scores en %) (Isabel et al., 2004).

(B) La LT-ARM est affectée seulement quand on bloque la neurotransmission depuis les lobes α'/β' (pilote *4-59*) et non depuis α/β (pilote *c739*) ni γ (pilote *NP21*) (Bouzaiane et al., 2015)

Des études d'imagerie fonctionnelle ont pu ajouter des pierres à l'édifice en ce qui à trait aux populations requises pour le rappel de la MLT. En observant l'activité calcique *in vivo* des KC grâce à la sonde GCaMP, il a été observé que les neurones α/β répondent aux odeurs présentées ainsi qu'aux chocs électriques par une augmentation de cette activité. De façon remarquable, chez des drosophiles ayant subi un conditionnement espacé, la réponse calcique à l'odeur associée aux chocs électriques augmente par rapport à celle de drosophiles naïves, à partir de 9h après le conditionnement, spécifiquement dans les lobes α (Yu et al., 2006) . Cette augmentation nécessite une synthèse protéique *de novo*, et disparaît lorsque le facteur de transcription CREB est inhibé, ainsi que dans 26 mutants de MLT (Akmal et al.,

2011). Ces données indiquant une trace mnésique dans les lobes α corroborent l'implication des KC α/β dans le rappel de la MLT.

V.3.2 Mémoire appétitive

La sortie des CP est également requise pour le rappel de la mémoire appétitive, comme le laissait entendre le fait que les informations liés aux SC+ et SI appétitif converge sur les CP. Une étude majeure pour le domaine, réalisée dans notre équipe, a montré que le rappel de la MCT, mesurée 1h30–2h après conditionnement, ne requiert que la neurotransmission des neurones γ mais pas des neurones α/β . Inversement, le rappel de la MLT n'implique que la signalisation par les neurones α/β , mais pas par les neurones γ . Les neurones α'/β' ne sont requis dans aucune des deux situations (Trannoy et al., 2011). Des résultats similaires, mais avec une dynamique légèrement différente, ont été publiés par l'équipe de Scott Waddell (Perisse et al., 2013) : dans cette étude, la neurotransmission depuis les neurones α/β est nécessaire pour le rappel dès 2 heures après conditionnement mais pas 30 minutes après le conditionnement. Des différences de conditions d'élevage entre les deux laboratoires pourraient expliquer cette cinétique différente, mais cela ne remet pas en cause l'idée d'une MCT appétitive formée dans et restituée par les neurones γ et d'une MLT, ainsi que peut-être sa forme précurseur, au niveau des neurones α/β .

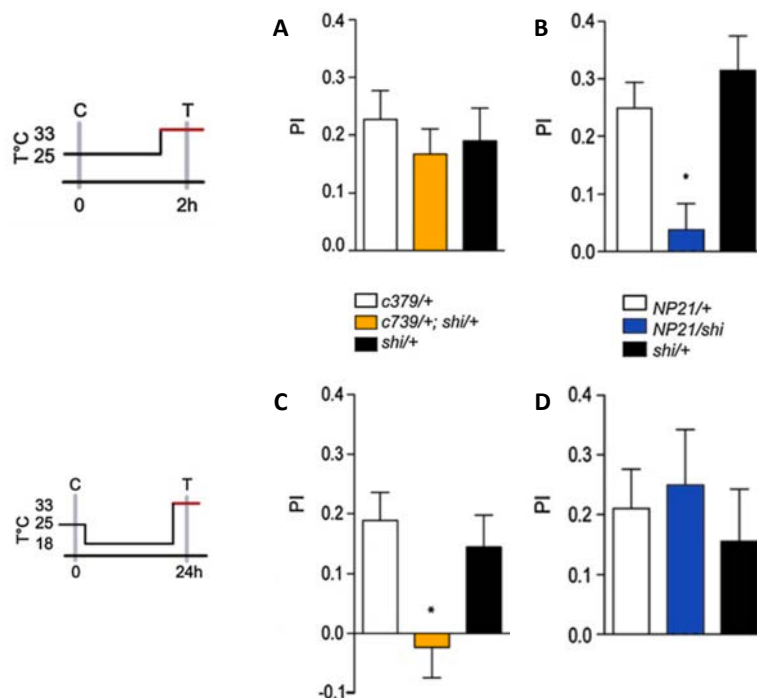


Figure 42 : Cellules de Kenyon requises lors du rappel des mémoires appétitives

Pour la mémoire à 2h, le blocage de la neurotransmission des lobes α/β n'induit pas de défaut de mémoire : ils ne sont pas requis (A). Réciproquement, la sortie des lobes γ est requise pour cette forme de mémoire (B).

Pour la mémoire appétitive à long terme, l'efférence des lobes α/β est requise (C), mais pas des lobes γ (D) (Trannoy et al., 2011).

VI. Rôle des neurones efférents aux Corps Pédonculés dans la mémoire associative olfactive

VI.1 Description des efférences des Corps Pédonculés

Grâce aux lignées enhancer-trap Gal4, des populations neuronales efférentes aux CP ont pu être décrites. Certaines de ces populations neuronales jouent un rôle spécifique dans le rappel mnésique. Notre laboratoire a été pionnier dans la caractérisation de ces « neurones du rappel ».

Grâce au développement à grande échelle du système Split-Gal4 à Janelia Farm Research Campus, Aso et al. ont pu décrire de manière exhaustive les neurones efférents aux CP. Comme les neurones afférents, ils couvrent l'ensemble des Corps Pédonculés, que leurs projections découpent en domaines (Figure 43).

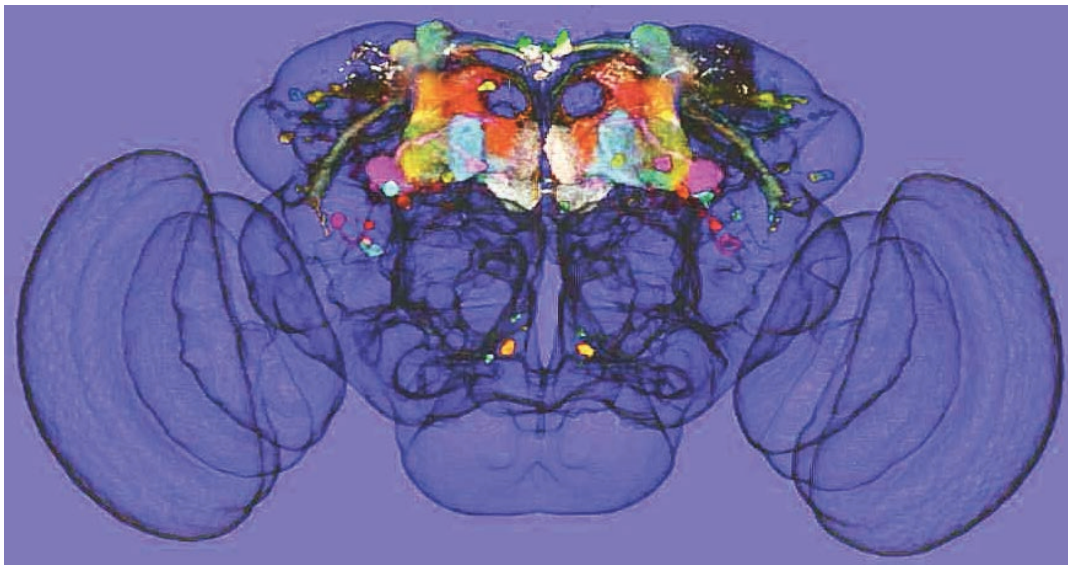


Figure 43 : Les neurones efférents couvrent les Corps Pédonculés

L'ensemble des projections dendritiques des neurones efférents contacte toute la surface des lobes des CP (Aso et al., 2014)

Ils ont pu en dénombrer 34, regroupés parmi 21 types cellulaires, selon une classification reposant sur les zones des CP contactées par leurs dendrites. Dans leur travail de description anatomique, ils ont également déterminé les neurotransmetteurs utilisés par ces neurones efférents (Figure 44).

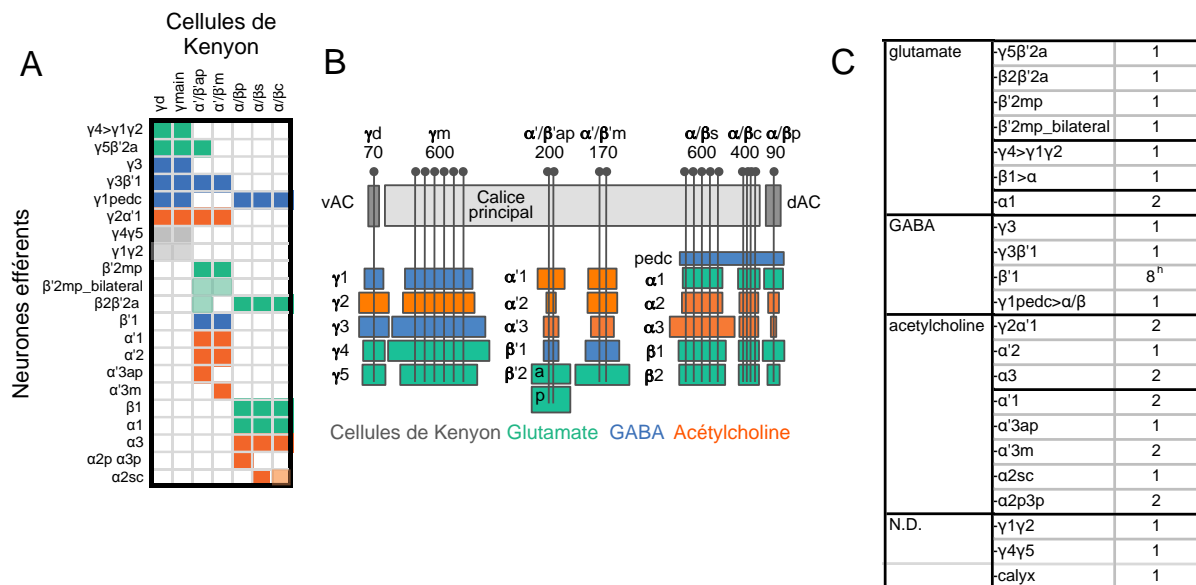


Figure 44 : Description anatomique des neurones efférents aux CP

(A) Matrice de connectivité des 21 types neuronaux efférents et des 7 types de Cellules de Kenyon

(B) Diagramme des lobes des CP. On visualise les différents neurones de sortie que contacte un axone d'un type donné de KC. Le code couleur indique le neurotransmetteur employé par chaque neurone efférent.

(C) Tableau indiquant le nombre de neurones par type cellulaire, pour chaque hémisphère (Aso et al., 2014).

VI.2 Neurones DPM et APL

Nous avons vu jusqu'à présent des neurones aux projections ségréguées sur les lobes des CP et qui sont soit afférent soit efférents. Mais deux neurones n'obéissent pas à ces règles : les DPM ('Dorsal Paired Medial') et les APL ('Anterior Paired Lateral') sont des neurones individuels dont les projections couvrent l'ensemble des lobes des CP (Figure 45). En outre, ils présentent la particularité d'être à la fois afférents et efférents aux KC, et on ne leur connaît à ce jour aucun autre partenaire synaptique hors des CP.

Les neurones DPM innervent l'ensemble des lobes des CP, la base du pédoncule mais pas la région des calices (Pitman et al., 2011; Waddell et al., 2000). Leurs corps cellulaires

(un par hémisphère) sont situés dorsalement et près de la ligne médiane du cerveau. Les neurites des DPM se séparent en deux branches principales, une branche projetant sur les lobes α et α' et une autre branche projetant de manière horizontale sur les lobes β , β' et γ . Les neurones DPM sécréteraient le neuropeptide Amnésiac (Waddell, et al., 2000) et utilisent également les neurotransmetteurs sérotonine (Lee et al., 2011) et GABA (Haynes et al., 2015)g.

Les neurones APL innervent les lobes, le pédoncule et les calices. Leurs corps cellulaires (un par hémisphère) sont localisés latéralement, et dorsalement par rapport au protocérebium ventro-latéral (Figure 45) (Tanaka et al., 2008). Ces neurones seraient GABAergiques (Liu and Davis, 2009) et octopaminergiques (Wu et al., 2013). Ils jouent un rôle important dans le codage de l'information olfactive : une rétro-inhibition entre les KC via les neurones APL permet de réguler et de maintenir le codage épars des odeurs au niveau de la population des KC (Lei et al., 2013; A. C. Lin et al., 2014).

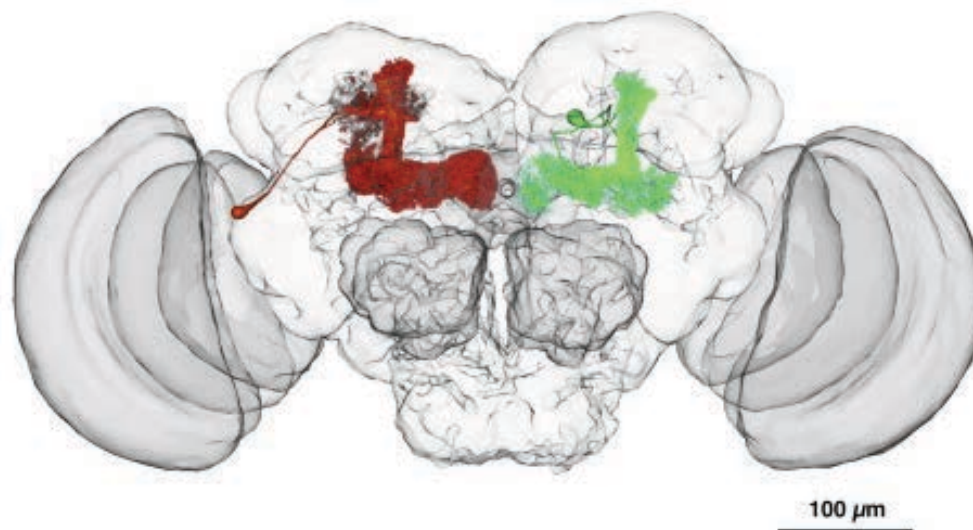


Figure 45 : Modélisation 3D des neurones APL et DPM au sein du cerveau de drosophile

La localisation des corps cellulaires et des projections neuronales au niveau des CP est montrée pour les DPM (vert) et APL (rouge) (Pitman et al., 2011). Par souci de clarté, un seul neurone de chaque type a été représenté par hémisphère, mais chaque hémisphère contient les deux.

Pour finir, il a été montré que ces deux neurones DPM et APL sont liés par des jonctions communicantes au niveau de leurs projections sur les CP (Wu et al., 2011).

VI.3 Spécificité du rappel au niveau des neurones efférents

VI.3.1 Mémoire aversive

Les travaux de Séjourné et al., (2011) ont identifié les neurones MB-V2 (désormais dénommés MBON α 2sc, MBON α' 1 et MBON α' 3, selon la nomenclature adoptée dans les travaux de Aso et al. à JFRC) comme neurones de rappel de la mémoire aversive. Ce sont des neurones cholinergiques et efférents aux lobes verticaux des CP. Deux sous-types ont été décrits : les neurones MB-V2 α sont efférents à partie centrale des lobes α , tandis que les neurones MB-V2 α' sont efférents à la partie supérieure des lobes α' (Figure 46). Ils projettent sur le protocérébrum moyen supéro-médial (msmpr) et la corne latérale, impliquée dans la réponse innée aux odeurs aversives. Le circuit KC-V2-CL constitue donc une sorte de dérivation de l'ACT qui relie directement les LA à la corne latérale via les neurones de projection.

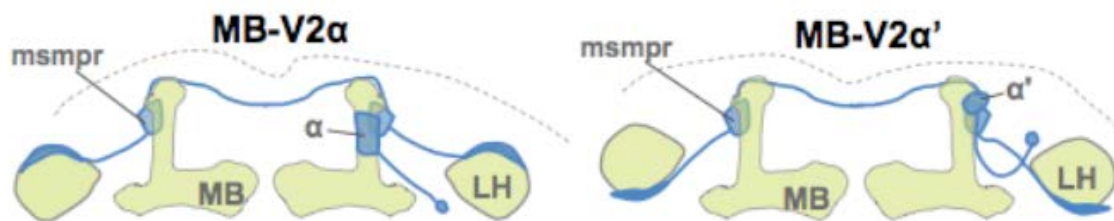


Figure 46 : Anatomie des neurones MB-V2

Les neurones MB-V2 incluent deux types neuronaux en fonction de leur projection au niveau des CP. Schéma de gauche, les neurones MB-V2 α projettent sur les lobes α , la partie dorsale de la corne latérale (CL) et au niveau du msmpr. Schéma de droite, les MB-V2 α' projettent sur le bout des lobes α' , sur la partie ventrale de la corne latérale et au niveau du msmpr (Séjourné et al., 2011).

Le blocage de la neurotransmission synaptique des neurones MB-V2 pendant la phase de rappel affecte la mémoire immédiate et à 2 heures après un cycle unique de conditionnement, et à 24 heures après un conditionnement espacé. Cependant, la mémoire à 2 heures n'était pas complètement abolie. Ceci suggère que d'autres neurones que les MB-V2 sont aussi requis pour le rappel de la mémoire à 2h.

Depuis, les résultats de Bouzaiane et al., 2015 ont permis de préciser la carte des neurones requis pour les différentes formes de mémoire aversive. Les MB-V2 sont finalement requis pour la ST-ARM (mais pas la MCT), la MTM (mais pas la MT-ARM) et la MLT. Dans ces

travaux, la découverte de nouveaux neurones à permis de combler les lacunes du rappel des mémoires aversives : des neurones glutamatergiques dénommés MB-M6 efférents aux lobes γ et β' (MBON $\gamma\beta'2a$ selon la nouvelle nomenclature) prennent en charge le rappel de la MCT, de la MT-ARM et également la LT-ARM.

On atteint donc une cohérence totale avec les populations de cellules de Kenyon requises pour ces différentes formes de mémoire, comme l'illustre la figure 47

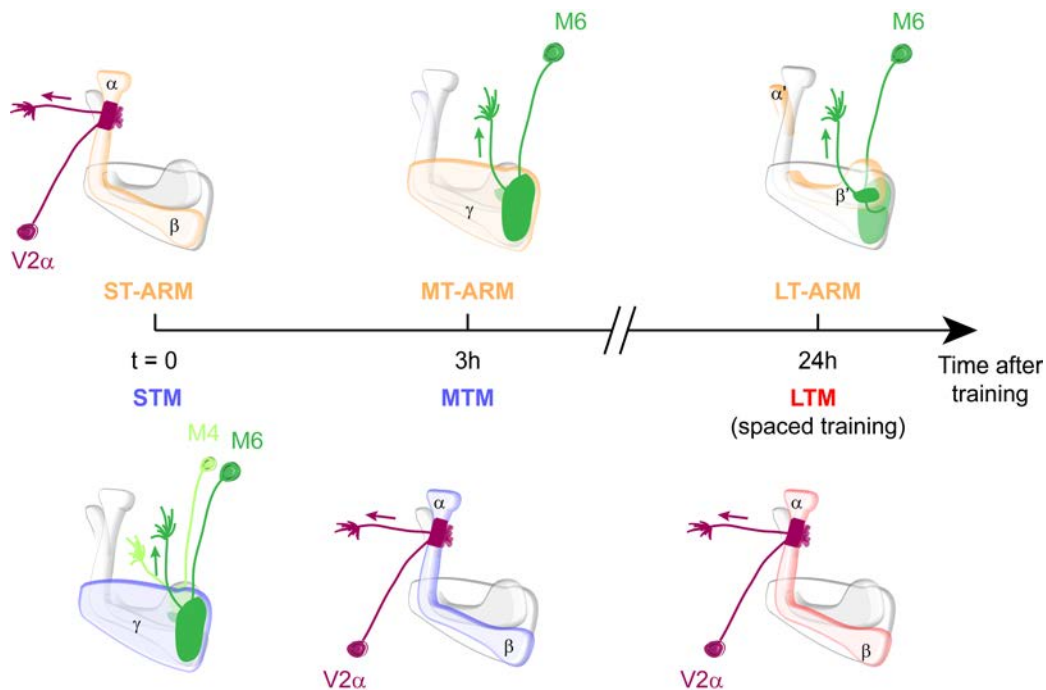


Figure 47 : Neurones efférents et Cellules de Kenyon requis pour le rappel des différentes formes de mémoire aversive (Bouzaiane et al., 2015)

De plus, dans l'étude de Séjourné et al. (2011), les auteurs ont pu identifier une trace mnésique dans ces neurones : dans la fenêtre de 2–3 heures après conditionnement, on assiste à une baisse de la réponse calcique à l'odeur précédemment associée aux chocs électriques.

VI.3.2 Mémoire appétitive

Les premiers neurones efférents identifiés dans le rappel de la mémoire appétitive sont spécifiques de la MLT. Il s'agit des neurones MB-V3 (MBON $\alpha3$ selon la nomenclature de Aso et al. à JFRC), deux paires de neurones cholinergiques efférents des extrémités dorsales des lobes α et dont les terminaisons pré-synaptiques se situent dans la région du protocerebrum antérieur medial interne (aimpr) (Figure 48) (Plaçais et al., 2013).

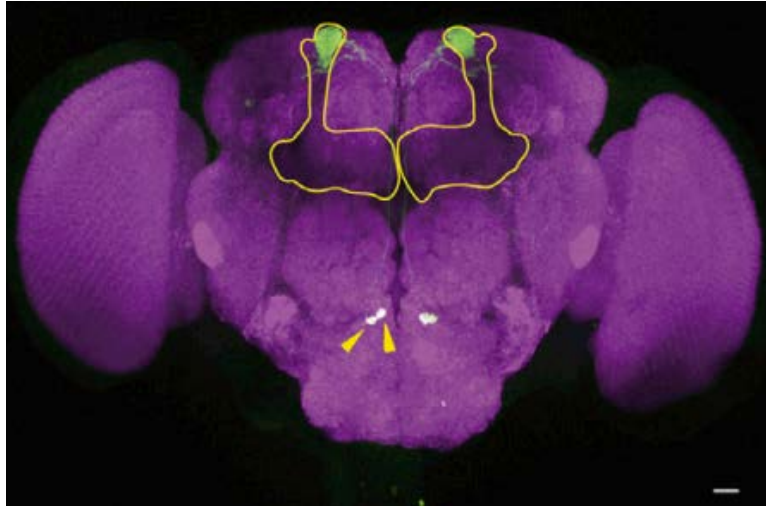


Figure 48 : Localisation des neurones MB-V3

Marquage immunohistochimique montrant la GFP exprimée à la membrane des neurones MB-V3 et un contremarquage du neuropile via un anticorps anti-synapsin (magenta). Les corps cellulaires des neurones MB-V3 sont indiqués par les flèches. Le marquage montre deux neurones par hémisphère et les CP sont entourés par le trait jaune (Plaçais et al., 2013).

Le blocage de la neurotransmission des MB-V3 pendant la forme de rappel induit un défaut de MLT (Plaçais et al., 2013). Au niveau physiologique, une réponse calcique augmentée pour l'odeur SC+ par rapport à une réponse naïve reflète leur rôle dans le rappel. Par ailleurs, le blocage de la neurotransmission des neurones MB-V3 pendant le rappel de la MMT n'entraîne pas de défaut de mémoire, en toute cohérence avec l'indépendance de la MMT et de la MLT appétitives en terme de circuits neuronaux.

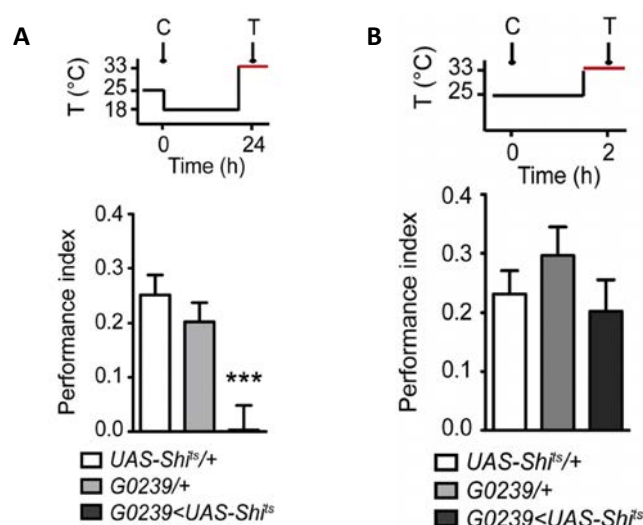


Figure 49 : Les neurones MB-V3 sont requis spécifiquement pour le rappel de la MLT appétitive

Le blocage de la neurotransmission des neurones MB-V3 affecte le rappel de la MLT appétitive (A) mais pas le rappel de la MCT appétitive (B) (Plaçais et al., 2013).

Les travaux d'Emna Bouzaiane se sont attachés à rechercher si les neurones MB-M6 impliqués dans le rappel de la mémoire aversive pourraient également participer au rappel de certaines formes de mémoire appétitive. De fait, les données montrent qu'ils sont nécessaires pour le rappel de mémoire appétitive à 2 heures (thèse de doctorat d'Emna Bouzaiane). Ceci est cohérent avec une sortie de la mémoire depuis les lobes γ , innervés par les neurones MB-M6. Les récents travaux de l'équipe de Scott Waddell sont venus confirmer le rôle des neurones MB-M6, que ce soit pour le rappel de plusieurs formes de mémoire aversive que pour la mémoire appétitive à 2 heures (Owald et al., 2015).

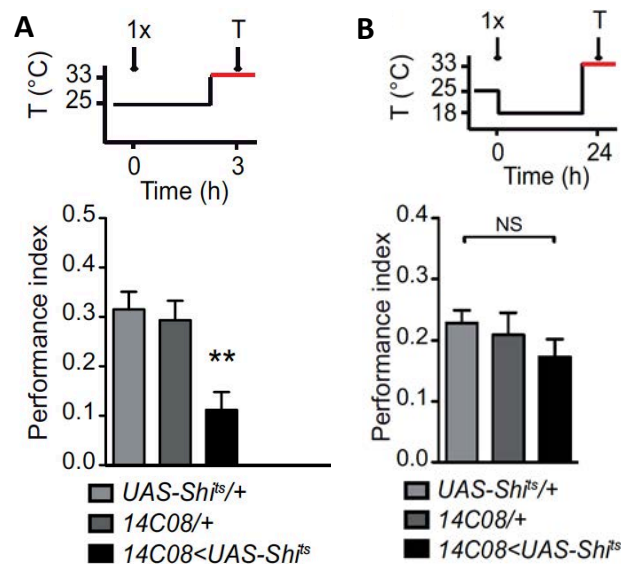


Figure 50 : Le blocage des neurones MB-M6 affecte le rappel de la mémoire appétitive à 3 heures

Bloquer la neurotransmission des MB-M6 pendant le rappel crée un défaut de mémoire appétitive à 3h (A). En revanche, les bloquer pendant le rappel de la MLT appétitive n'a aucune incidence (B) (Bouzaiane et al., 2015)

VII. Questions et objectifs

Si beaucoup d'inconnues demeurent sur ce qui a trait aux étapes d'apprentissage et de consolidation, nous avons pris le parti pour mon doctorat de nous focaliser principalement sur l'étape de rappel de la mémoire associative olfactive.

VII.1 Spécificités des réseaux neuronaux du rappel

Comme nous l'avons montré dans la partie V.3 et VI.3, de nombreuses données existent quant à des neurones impliqués dans le rappel de différentes formes de mémoire aversive et appétitive. Cependant, rien ne nous dit que quand des neurones ont été identifiés, ils soient les seuls.

Des populations neuronales nécessaires ont été identifiées, mais cela ne permet pas de répondre à la question de l'existence de réseaux spécifiques du rappel. Dans cette optique, il faudrait tester de façon systématique l'implication de chaque type neuronal pour les différentes formes de mémoire. Grâce à l'arrivée sur le marché des banques de lignées Split-Gal4 couvrant intégralement la diversité des neurones intrinsèques et extrinsèques aux Corps Pédonculés, il est devenu possible de mettre en œuvre cette étude.

Nous avons donc décidé d'identifier de manière exhaustive les neurones du rappel, au niveau des KC elles-mêmes et au niveau des neurones efférents aux CP, en nous restreignant, dans un premier temps, aux formes de mémoire les plus intrigantes et complexes : les MLT appétitives et aversives.

VII.2 Dissection des réseaux neuronaux du rappel en aval des neurones efférents aux Corps Pédonculés

Le but de toutes nos études est de comprendre le fonctionnement de la mémoire chez la drosophile. Ceci passe par la compréhension des voies de signalisation internes aux neurones, mais également par la connaissance de toute l'architecture du réseau mis en jeu. Ces approches sont complémentaires et permettent au final de comprendre la logique de fonctionnement du système nerveux.

Pour pouvoir comprendre comment l'information mnésique donne lieu à une réaction comportementale, comment différents messages nerveux sont intégrés aux stades suivants, il est nécessaire de connaître toutes les étapes du cheminement de l'information mnésique efférente.

Nous avons décidé de tenter d'identifier les neurones étant le maillon suivant, par rapport aux neurones efférents aux CP, en s'appuyant sur la connaissance d'un type de neurones efférents requis pour plusieurs formes de mémoire aversive, les neurones MB-V2. Nous voulions donc savoir si nous pouvions trouver des neurones au rang « n+1 » requis pour

le rappel d'au moins une forme de mémoire aversive, si ces neurones seraient alors requis pour le rappel des autres formes de mémoire dépendant des MB-V2 et s'ils pouvaient également être le point de convergence d'autres neurones efférents aux CP.

Matériel et méthodes

I. Elevage des drosophiles

Les drosophiles sont élevées sur du milieu standard contenant de la farine de maïs, de la levure, un fongicide, et de l'eau. L'élevage des drosophiles s'effectue dans des étuves dont la température (18°C) et l'humidité (60%) sont finement régulées, et ayant un cycle d'éclairage 12h jour/ 12h nuit. La souche de référence est *Canton Special* (Cs). Nous procédons à l'homogénéisation du fond génétique des différentes lignées étudiées par quatre générations successives d'« *outcross* » avec une lignée de même fond génétique que Canton S mais portant l'allèle récessif w^{118} du gène *white*, dont la conséquence phénotypique est la perte de coloration des yeux. Ceci permet un suivi facile de la présence de transgènes qui, dans leur grande majorité, sont porteurs de séquences « *mini-white* » aboutissant à une coloration plus ou moins intense des yeux. L'homogénéisation du fond génétique permet de s'affranchir d'effets non-spécifiques, notamment d'éventuelles mutations compensatoires pouvant influencer le phénotype observé.

II. Souches de drosophiles utilisées

Les lignées Split-Gal4 utilisées comprennent deux inserts, chacun apporté dans un vecteur pBPGUw (Pfeiffer et al., 2008). L'insert « héli-Split » correspondant au *DNA Binding Domain* est toujours inséré au niveau du site attP2 (Chromosome III). L'insert correspondant à l'*Activating Domain* est lui inséré soit au niveau du site su(Hw)attP8 (chromosome X) (lignées MBXXXA), soit au niveau du site attP40 (chromosome II) (lignées MBXXXB), soit au niveau du site VK00027 (chromosome III) (lignées MBXXXC) (Pfeiffer et al., 2010).

Les lignées Gal4 (non split) provenant de la banque flylight de JFRC et les lignées de la banque VT sont apportées par un vecteur pBPGUw inséré au site attP2 (chromosome III) (Pfeiffer et al., 2010).

La lignée UAS-Shi_{JFRC} (pJFRC100) est constituée d'un vecteur pBPGUw comprenant la construction 20XUAS-TTS-Shibire_{ts1}-p10, inséré au site VK00005 (chromosome III) (Pfeiffer et al., 2012)

La lignée UAS-Shi^{GDSM} a été générée dans notre équipe par ségrégation d'une des multiples insertions présentes dans la lignée décrite dans (Kitamoto, 2002). L'insertion que nous utilisons est sur le chromosome III.

III. Comportement

III.1 Croisement et élevage

Les drosophiles utilisées pour les expériences de comportement sont la descendance de croisements élevés à 18°C. Pour ces croisements, environ soixante femelles vierges et une vingtaine de mâles sont réunis dans des bouteilles de milieu nutritif. Ces parents sont ensuite transférés dans de nouvelles bouteilles tous les trois à quatre jours afin d'optimiser le niveau de ponte pour générer une naissance régulière de la descendance, et ainsi éviter une surpopulation dans les bouteilles de milieu engendrant une compétition pour la nourriture. Ceci permet d'optimiser la forme des drosophiles, favorisant de bons scores de mémoire.

III.2 Conditionnement aversif

III.2.1 Préparation des drosophiles

Afin de ne pas utiliser des drosophiles tout juste écloses lors des expériences de comportement, on place des adultes âgés de 0 à 2 jours dans des bouteilles de milieu frais pendant 12 à 24 heures avant le conditionnement. A chaque « n » de chaque génotype de l'expérience à venir, correspondent environ 80 drosophiles. Cette « mise en bouteille » est placée dans une étuve dédiée, à 18°C et 60% d'humidité. 30 minutes avant le début du protocole de conditionnement, les drosophiles sont transférées dans les pièces de comportement à 25°C et 80% d'humidité, pour un équilibrage progressif en température.

III.2.2 La phase de conditionnement

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

Les molécules odorantes utilisées pour le conditionnement sont le 3-octanol (OCT) et le 4-méthylcyclohexanol (MCH), qui sont deux composés naturellement répulsifs pour les drosophiles. On dilue 58 µl d'OCT et 52 µl de MCH dans environ 170 ml d'huile de

paraffine, on obtient alors les concentrations respectives de $3,6 \cdot 10^{-4}$ M et $3,25 \cdot 10^{-4}$ M. Pour le conditionnement, un groupe de 30 à 50 drosophiles est introduit dans chacun des six trous d'un barillet adapté (Figure 51), les parois de chaque trou étant tapissées d'une grille électrique. Le barillet est ensuite branché au flux d'air et au circuit électrique. Une fois le tout connecté, on lance un programme informatique (contrôlant les électrovannes qui assurent le débit d'air en provenance des bouteilles d'odeurs ainsi que la distribution des chocs électriques) permettant le déroulement du conditionnement.

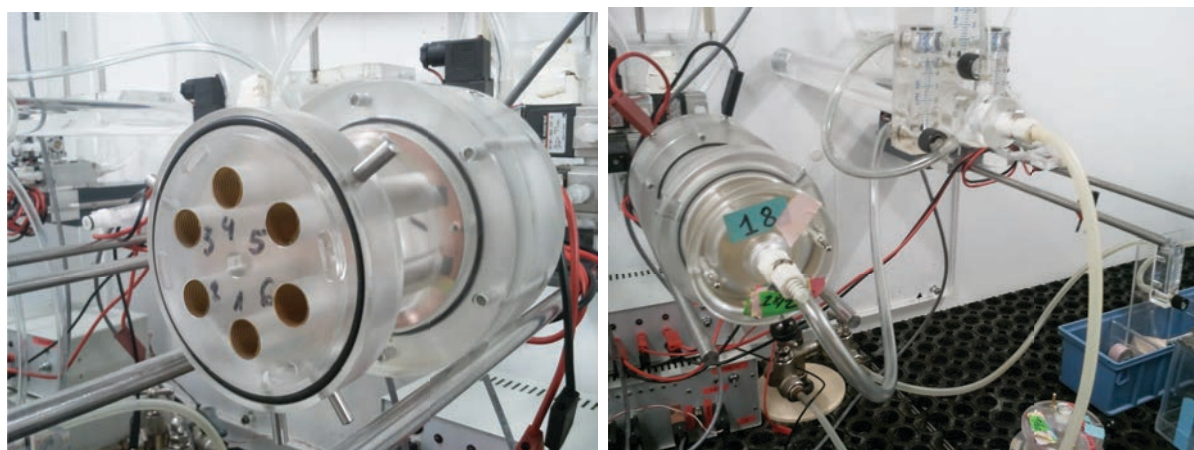


Figure 51 : Dispositif utilisé pour le conditionnement aversif.

Image de gauche : barillet pour de conditionnement aversif, composé de six trous, chacun recouvert d'une grille électrique. Image de droite : barillet chargé de drosophiles et relié au système de circulation d'air.

Un cycle de conditionnement consiste en :

- 1 période préparatoire de 90 secondes d'air
- 1 période de 1 minute de perfusion de la première odeur associée à 12 chocs électriques de 60 Volts
- 1 période de 45 secondes d'air
- 1 période de 1 minute de perfusion de la deuxième odeur
- 1 période de 45 secondes d'air.

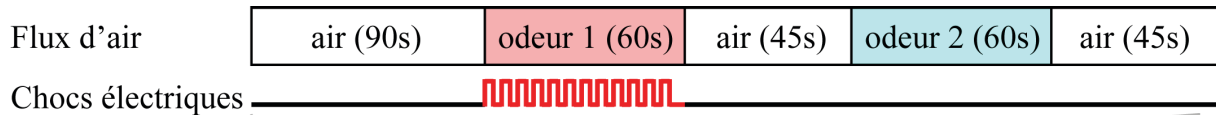


Figure 52 : Représentation d'un cycle de conditionnement aversif

Un conditionnement est composé de deux expériences réciproques, une première où les chocs électriques sont délivrés en même temps que l'OCT et une deuxième où les chocs électriques sont délivrés avec le MCH. Les deux expériences réciproques sont toujours réalisées l'une à la suite de l'autre afin qu'elles soient effectuées dans les conditions les plus proches possibles.

Trois protocoles différents existent selon le type de mémoire que l'on veut produire :

- Le protocole simple : ce protocole consiste en un seul cycle de conditionnement. Il est utilisé pour étudier la mémoire entre 0 et quelques heures après le conditionnement (le plus souvent 3 heures).

- Le protocole massé : ce protocole de conditionnement consiste en une répétition de cinq conditionnements simples à la suite, sans intervalle de repos. Il est utilisé pour étudier la MRA 24h après conditionnement (LT-ARM).

- Le protocole espacé : dans ce protocole, un conditionnement simple est répété cinq fois avec une période de repos de quinze minutes entre chaque cycle. C'est le protocole qui génère la formation de MLT.

Une fois le conditionnement terminé, les drosophiles sont récupérées et transférées dans de nouvelles bouteilles de milieu. Lorsqu'il est prévu que la mémoire soit testée à 24 heures (ce qui est généralement le cas après un protocole massé ou espacé), les drosophiles sont conservées dans l'étuve à 18°C et 60% d'humidité entre le conditionnement et le test. Dans les autres cas, elles sont conservées à 25°C dans la pièce où a eu lieu le conditionnement, jusqu'au moment du test.

III.2.3 La phase de test

Pour tester la mémoire associative olfactive des drosophiles, nous disposons d'un système permettant d'offrir le choix à la drosophile d'aller vers l'une ou l'autre des odeurs utilisées lors du conditionnement. Cet appareil est le labyrinthe en T ou « T-maze » (Tully et al. 1985), relié aux bouteilles contenant chacune des deux odeurs (Figure 52). La

concentration des molécules odorantes est la même que durant le conditionnement. Les drosophiles à tester sont introduites dans la partie centrale coulissante de l'appareil. Après avoir connecté les tuyaux apportant les flux d'air chargés d'odeur, on éteint la lumière de la pièce, puis on descend l'ascenseur. Pendant une minute, les drosophiles se répartissent entre les deux compartiments (Figure 52). Passé ce délai, on remonte l'ascenseur, stoppant la communication entre les deux compartiments. Il ne reste plus qu'à récupérer les drosophiles présentes de chaque côté dans des tubes séparés. Immédiatement, on teste le lot de drosophiles réciproque (conditionné sur l'autre odeur).

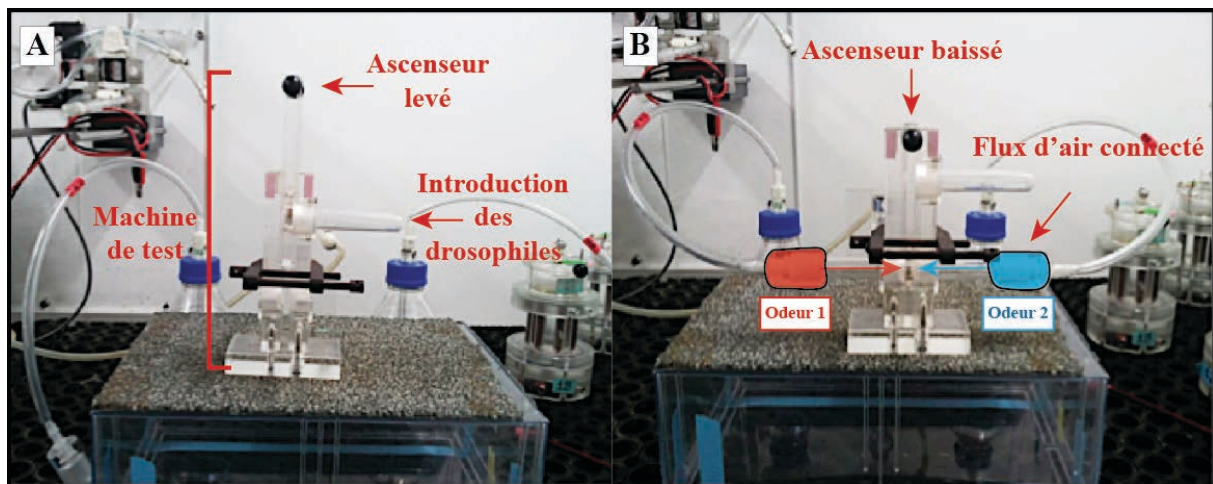


Figure 53 : Dispositif de test

(A) *Labyrinthe en T* ou « *T-Maze* ». L'appareil comprend un étage supérieur où l'on introduit les drosophiles, et un étage inférieur où elles sont testées. (B) Lorsque l'on descend l'ascenseur central, les drosophiles arrivent au point de confluence des deux odeurs : elle peuvent alors effectuer leur choix pour l'un des deux compartiments.

III.2.4 Le score de mémoire

L'indice de performance de mémoire (IP), ou score de mémoire, reflète la proportion de drosophiles ayant choisi la bonne odeur pendant le test (l'odeur non appariée aux chocs électriques). Ce score est une moyenne entre les deux expériences réciproques. On obtient l'IP en moyennant les scores des deux $1/2\lambda$. Le score pour un $1/2\lambda$ est calculé de la façon suivante:

$$\lambda_{1/2} = \frac{(\text{Nb drosophiles SC -}) - (\text{Nb drosophiles SC +})}{(\text{Nb drosophiles SC +}) + (\text{Nb drosophiles SC -})}$$

Nb drosophiles SC- : nombre de drosophiles ayant fait le bon choix (odeur non associée aux chocs électriques).

Nb drosophiles SC+ : nombre de drosophiles ayant choisi le mauvais côté (odeur associée aux chocs électriques).

Puis l'IP (ou λ) pour un groupe de drosophiles complet:

$$\lambda = \frac{\lambda_{1/2OCT} + \lambda_{1/2MCH}}{2}$$

Les scores peuvent s'étendre de -1 à 1.

Un score de 0, signifiant qu'il y a autant de drosophiles de chaque côté, correspond à l'absence de mémoire. Un score de 1 signifie que toutes les drosophiles ont évité l'odeur associée aux chocs électriques. Finalement, un score de -1 signifierait que toutes les drosophiles ont attribué une valence positive à l'odeur associée aux chocs électriques (SC+).

III.3 Conditionnement appétitif

III.3.1 Préparation des drosophiles

On place une centaine de drosophiles récemment écloses sur du milieu frais pendant 24 heures à 18°C et 60% d'humidité. Il est nécessaire de faire subir une période de jeûne de 21H aux drosophiles, afin qu'elles se trouvent dans un état où d'une part elles consomment la nourriture (le sucre du conditionnement), et d'autre part qu'elles soient motivées pour former une mémoire de cette association. La veille du conditionnement, on prépare des bouteilles de jeûne : une bouteille en plastique de 175 ml contenant un disque de coton imbibé de 6,5 ml d'eau Evian (Colomb et al. 2009; Trannoy et al. 2011). 21 heures avant le conditionnement, on transfère environ 50 drosophiles par bouteille de jeûne, ce qui correspondra à un 1/2 λ . Ensuite les drosophiles sont placées à 25°C (température à laquelle leur métabolisme les placera en situation de jeûne effectif) et 80% d'humidité jusqu'au début du conditionnement.

III.3.2 La phase de conditionnement

Les odeurs utilisées dans notre laboratoire sont les mêmes que pour le conditionnement aversif, utilisées aux mêmes concentrations.

Les barillets de conditionnement appétitif ont été adaptés des barillets aversifs (Pascual et al. 2001) décrits par Colomb. J (Colomb et al. 2009). La présentation d'une récompense sucrée nécessite la préparation de «tubes sucre» : une solution de 2M de sucrose est déposée sur le tiers inférieur de la surface du tube en plastique (Figure 54) et laissée à sécher pendant 24 heures. Un insert rotatif permet de limiter l'accès au sucre uniquement quand l'expérimentateur effectue une rotation de 180° au barillet lui-même. Ainsi au début du conditionnement, les drosophiles d'une bouteille de jeûne sont introduites dans l'un des trois trous du barillet, avec le tube sucre en position inaccessible. Après branchement au système de perfusion d'odeur, le programme informatique usuel va permettre le déroulement du cycle de conditionnement. A l'inverse du conditionnement aversif, où tout est automatisé, ici, l'expérimentateur va devoir tourner manuellement le barillet, afin de rendre le sucre accessible aux drosophiles au moment précis de la perfusion de l'odeur devant être associée à la récompense.

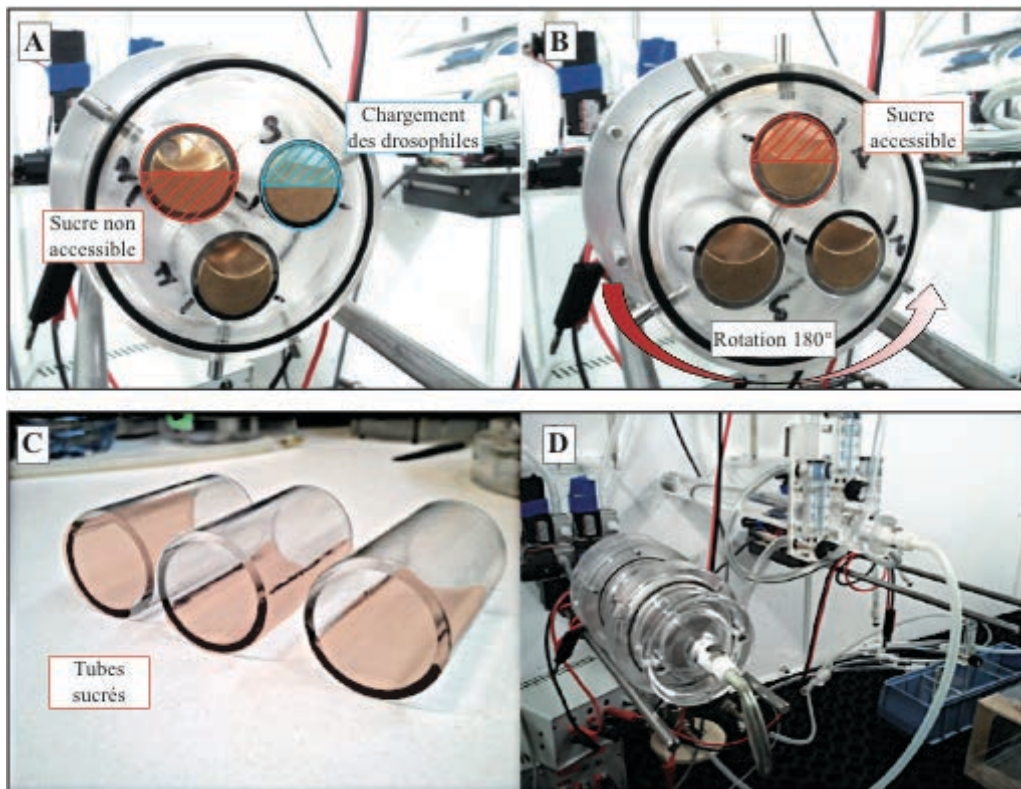


Figure 54 : Dispositif de conditionnement appétitif

(A) Barillet de conditionnement appétitif, dont chacun des trois reçoit un tube en plastique recouvert de sucre sur 1/3 de sa surface. En position initiale, les drosophiles n'ont pas accès au sucre. (B) Après rotation de 180°, la portion sucrée du tube est accessible aux drosophiles. (C) Tubes en plastique sur lesquels a été appliquée la solution sucrée, sur seulement 1/3 de la surface

intérieure du tube (la couleur orange représente le sucre). (D) Dispositif chargé de drosophiles et relié au système de flux d'odeurs.

III.4 Spécificités liées à l'outil *Shi^{ts}*

Pour les expériences de blocage de la neurotransmission, l'usage de la protéine *Shi^{ts}* (Dubnau et al., 2001) est soumis à des conditions précises. La température restrictive utilisée est de 32/33°C. En règle générale, les drosophiles sont transférées à température restrictive au minimum 30 minutes avant l'expérience (par exemple, 30 min avant le test de mémoire si l'on veut étudier l'impact du blocage synaptique sur cette étape). La température standard des expériences de comportement (25°C), ainsi que la température d'élevage et de la période de consolidation entre le conditionnement et le test (18°C), correspondent à un régime « permissif » où *Shi^{ts}* est fonctionnelle.

III.5 Contrôles

III.5.1 Test de l'olfaction

Quand un génotype précis présente un défaut de mémoire, il est nécessaire d'évacuer l'hypothèse que ce défaut ne soit pas un déficit mnésique à proprement parler, mais provienne plutôt d'un défaut d'olfaction. Le test de l'olfaction est réalisé dans les conditions de l'expérience : on le fait par exemple à température restrictive quand on étudie un phénotype par blocage de la neurotransmission, et dans le cas de mémoire appétitive, les drosophiles sont testées à jeun. Le test d'olfaction consiste à vérifier, dans un « T-maze », que les drosophiles préfèrent bien l'air à l'odeur testée, naturellement répulsive. Après une minute de test, les drosophiles de chaque compartiment sont collectées séparément et comptées. Un demi-score de performance est utilisé comme 'n = 1'. Ce protocole permet également de valider une activité locomotrice des drosophiles normale. L'Indice de performance est calculé de la façon suivante :

$$IP = \frac{\text{Nb de drosophiles coté neutre} - \text{Nb de drosophiles coté odeur}}{\text{Nb de drosophiles total}}$$

III.5.2 Evitement aux chocs électriques

Ce protocole permet de vérifier que la sensibilité aux chocs électriques est intacte dans les différentes lignées utilisées. Deux barillets aversifs sont reliés face à face en position horizontale par une pièce en plastique. Un seul des deux barillets est électrisé et les

drosophiles doivent choisir entre les deux compartiments pendant une minute. Les drosophiles sont récupérées séparément, comptées et un indice de performance est calculé.

III.5.3 Test de la réponse au sucre

Le test est réalisé dans un « T-maze » et les drosophiles ont le choix entre un tube vide, d'un côté de l'appareil, et un tube recouvert d'une solution sucrée, de l'autre. La solution de sucrose est utilisée à 0,15 M et on l'applique sur des petits tubes en plastique 24 h avant le test pour que la solution sèche. Un tube sucre est utilisé pour quatre tests successifs et placé alternativement entre le côté droit et gauche. Après une minute, les drosophiles de chaque côté sont recueillies et comptées pour ensuite déterminer un score.

Chaque groupe de drosophile testé est utilisé comme 'n = 1', pour calculer un indice de performance :

$$IP = \frac{\text{Nb de drosophiles coté sucre} - \text{Nb de drosophiles coté neutre}}{\text{Nb de drosophiles total}}$$

III.6 Analyses statistiques

Pour comparer les scores de deux groupes de drosophiles, nous avons utilisé le test de Student (t-test). La *p-value* indique le degré de significativité.

Pour la comparaison des scores de trois groupes, nous avons utilisé une ANOVA suivi d'un de tests par paires selon la procédure de Newman-Keuls. Chaque graphique présenté affiche les indices de performance moyens +/- l'erreur standard de la moyenne (SEM). Pour chaque analyse, on donne la *p-value* relative à l'ANOVA, et, si l'ANOVA indique une différence significative, on indique sur le graphe la moins significative des comparaisons par paires entre le génotype d'intérêt et ses contrôles (par exemple, si $p < 0,05$ entre le génotype d'intérêt et le contrôle 1 et $p < 0,01$ entre le génotype d'intérêt et le contrôle 2, on indique le niveau de significativité minimal, soit *).

Dans le cas du criblage des lignées de la banque Split-Gal4, chacun des génotypes d'intérêt (chacune des lignées Split-Gal4 contrôlant l'expression de UAS-Shi_{JFRC}) est comparé en t-test avec le génotype contrôle commun (+/UAS-Shi_{JFRC}). Mais afin de prendre en compte la comparaison multiple de 80 génotypes avec un unique contrôle, nous avons appliqué une correction de Benjamini-Hochberg sur le seuil de significativité (Benjamini and Hochberg, 1995). Cela permet de contrôler le taux d'erreur de type I (ou *False Discovery*

Rate en anglais), c'est à dire de réduire l'occurrence de faux-positifs. La procédure de correction est la suivante :

- 1) La *p-value* est calculée pour chaque lignée
- 2) Les *p-values* sont classées (attribution d'un rang n , $n=1$ correspondant à la plus petite *p-value*)
- 3) A chaque *p-value* est associé un indice $i_n = \alpha \times n/N$ (où α est le seuil de significativité retenu, soit 0,05 ou 0,01, et N est le nombre total de *p-values* classées)
- 4) On identifie toutes les *p-values* étant inférieures à l'indice i_n qui leur est associé : ce sont tous les cas significatifs.

IV. Imagerie cérébrale *in vivo*

La préparation des drosophiles est effectuée selon le protocole déjà décrit (Fiala et al. 2003). Une drosophile naïve (ou conditionnée dans le cas d'imagerie de trace mnésique) est collée avec de la colle dentaire biocompatible (Protemp II, ESPE, Seefeld, Germany) sur une lamelle en plastique recouverte d'une fine feuille de plastique (Figure 55). La lamelle est ensuite placée dans une chambre adaptable à la platine du microscope. Le cerveau de la drosophile est recouvert d'une goutte de solution Ringer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 36 mM sucrose, 5 mM HEPES-NaOH [pH 7.3]). Une petite région de la cuticule est ôtée ainsi que les trachées. La drosophile est ensuite placée sous un microscope Leica TCS-SP5.

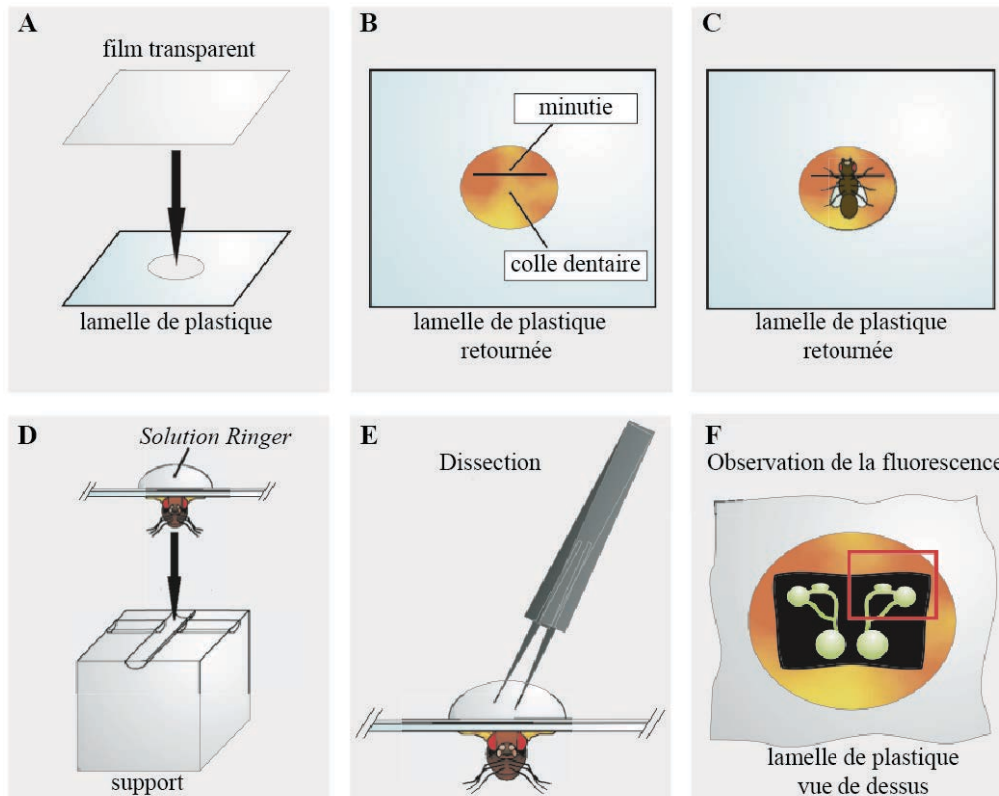


Figure 55 : Préparation des drosophiles pour l'imagerie

(A) Préparation de la lamelle d'imagerie. (B) Dépôt de colle dentaire sur la lamelle. (C) Drosophile collée sur la lamelle. (D) Positionnement de la lamelle avec la drosophile collée sur la cellule de dissection. (E) Dissection : ouverture de la capsule céphalique et retrait des trachées respiratoires. (F) Observation du signal du rapporteur exprimé sous le microscope.

Les expériences sont réalisées à la température de 20°C. Les acquisitions sont effectuées grâce au logiciel LAS-AF software (Leica). Les odeurs sont présentées aux drosophiles à l'aide d'un circuit d'air fermé guidé par des électrovannes pilotées par ordinateur. Ce circuit ainsi que le protocole d'acquisition d'images et les analyses sont décrits dans Séjourné et al. (2011).

Dans le cadre de l'imagerie calcique, les drosophiles expriment le rapporteur d'activité calcique UAS-GCaMP3 selon le patron d'expression dédié. L'intensité du signal calcique est représentative de l'activité des neurones exprimant la sonde. L'activité des neurones est donc rapportée par la trace de la variation de fluorescence normalisée $\Delta F/F_0$. Cette trace est analysée par différents programmes écrits en langage Matlab, selon qu'on analyse des réponses à un stimulus olfactif, ou l'activité spontanée des neurones dopaminergiques MV1 et MP1.

Résultats

I. Identification des neurones impliqués dans le rappel des mémoires à long terme aversive et appétitive

L'équipe de Gerald Rubin à Janelia Farm Research Campus (JFRC) a généré une banque de lignées Split-Gal4 dans l'objectif d'obtenir des pilotes d'expression spécifiques de tous les types neuronaux que l'on peut distinguer au sein des KC, mais aussi au sein des neurones extrinsèques aux KC, afférents ou efférents. Un type neuronal correspond à un ensemble de neurones (allant du neurone unique à un groupe de neurones) n'ayant pu être plus décomposé et dont les membres présentent des morphologies indiscernables. La genèse de cette banque de lignées devait permettre d'une part de parfaitement caractériser ces neurones (morphologie ; polarité ; neurotransmetteurs...), mais aussi d'en comprendre l'implication dans plusieurs comportements dont la drosophile est douée. L'objectif final était de dresser les motifs neuronaux requis pour chacun des comportements et d'éventuellement en établir les éléments communs. La collaboration avec JFRC a inclus plusieurs équipes pour mener différents criblages comportementaux : l'équipe de Ulrike Heberlein (JFRC) pour la mémoire associée à l'intoxication à l'éthanol, l'équipe de Michael Nitabach (JFRC) pour l'étude du sommeil, l'équipe de Divya Sitaraman (JFRC) pour l'étude de la locomotion, l'équipe de Hiromu Tanimoto (Max Planck Institute) pour l'étude des MCT aversive et appétitive, ainsi que de la mémoire visuelle (avec M. Reiser), et notre équipe.

Le lancement de ce projet a donc constitué une incroyable opportunité, en ouvrant la possibilité de décrypter intégralement, au niveau des CP, les réseaux neuronaux requis pour la mémoire associative olfactive, l'objet d'étude de notre équipe. Néanmoins, pour des raisons pratiques nous nous sommes restreints à étudier uniquement la phase de rappel de la mémoire, et ce pour les deux types de Mémoire à Long Terme, aversive et appétitive, qui relèvent particulièrement de notre expertise.

I.1 Identification systématique par approche Split-Gal4

I.1.1 La banque de lignées Split-Gal4 construites à Janelia Farm Research Campus couvre la quasi-totalité des Cellules de Kenyon et des neurones extrinsèques aux Corps Pédonculés

L'application de la technologie Split-gal4 à grande échelle par l'équipe de Gerald Rubin a nécessité de sélectionner environ 7.000 lignées Gal4 sur la base d'acquisitions confocales. Parmi celles-ci, environ 200 ont été sélectionnées pour faire la construction hémisplit p65ADZp (AD correspondant à la portion de la protéine Gal4 activatrice de la transcription) et environ 200 pour l'hémi-split ZpGdbd (dbd correspondant à la portion de la protéine Gal4 se liant à l'ADN). Parmi les 2.500 intersections intéressantes, environ 250 ont été choisies pour vérification de l'intensité d'expression et de la spécificité de marquage. Au final, 80 ont été retenues pour le criblage systématique par expériences comportementales (Figure 56). Elles permettent de cibler les différentes sous-populations constituant les KC, les neurones efférents et les neurones afférents.

Figure 56 : Patrons d'expression neuronale des lignées de la banque Split-Gal4 de JFRC

Représentation de la banque des 80 lignées initialement retenues pour l'étude comportementale et issue de la banque (de plus de 400 lignées) utilisée dans Aso et al., 2014a. On distingue pour chacune des lignées Split-Gal4 les types neuronaux marqués qui peuvent se répartir parmi les grands sous-ensembles des KC (orange), des neurones efférents aux CP (ou MBON pour Mushroom Body Output Neuron) (beige) et des neurones afférents dopaminergiques (bleu) ou octopaminergiques (brun foncé). Les neurones représentés en blanc sont des neurones à la fois efférents et afférents aux CP. On remarque qu'aucune lignée dans la banque ne permet de cibler les neurones DPM et APL, qui font partie des rares neurones à être à la fois afférents et efférents aux CP et à être sérotoninergiques et GABAergiques respectivement. L'intensité de l'expression pilotée est représentée par un code couleur arbitraire (où l'expression la plus intense correspond au plus foncé) (les chiffres indiqués dans les cases renseignent également de l'intensité d'expression, et ce pour tous les tableaux de ce type à suivre également).

Les lignées Split-Gal4 ont permis de caractériser avec précision les différents sous-types de KC. On connaît notamment le nombre de cellules marquées pour chaque sous-type (Figure 57 et Figure 58).

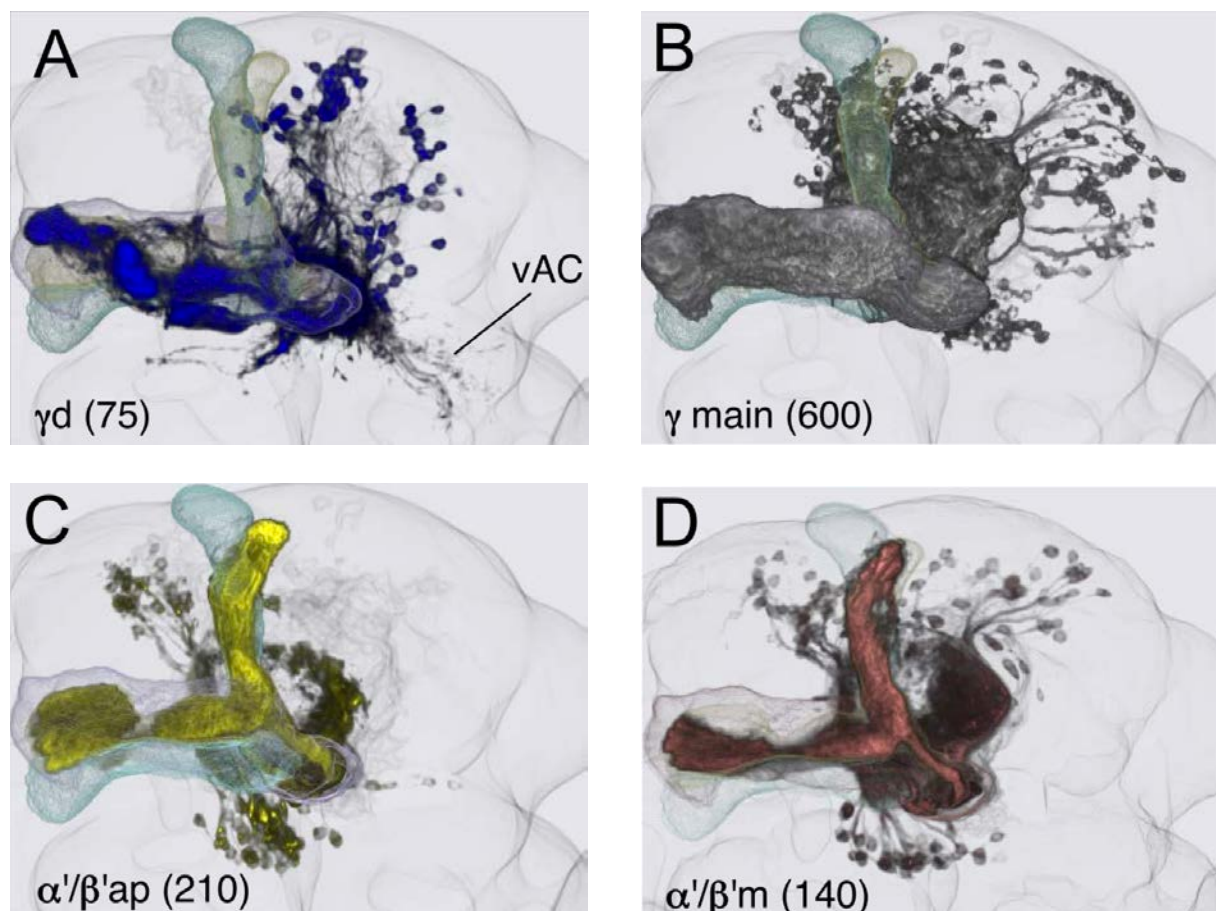


Figure 57 : Présentation des sous-types de Cellules de Kenyon γ et α'/β'

Les KC γ comprennent deux sous-types : les KC γ dorsal (A) et les KC γ principal (B). Les KC α'/β' comprennent deux sous-types : les KC α'/β' antéro-postérieur (C) et les KC α'/β' medial (D). Le nombre de neurones que compte chaque sous-type est indiqué entre parenthèses (Aso et al., 2014a).

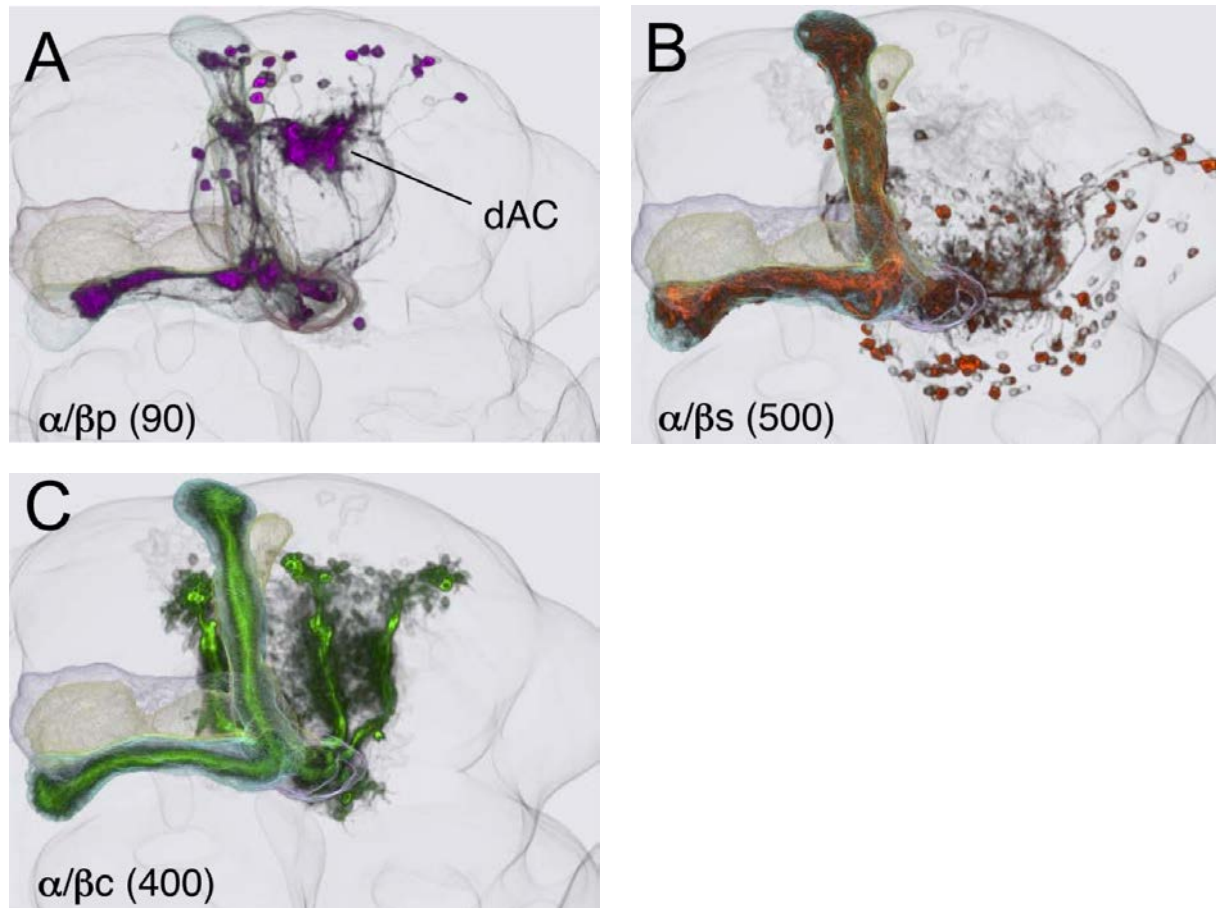


Figure 58 : Présentation des sous-types de Cellules de Kenyon α/β

Les KC α/β comprennent trois sous-types : les KC α/β postérieur (A), les KC α/β surface (B) et les KC α/β cœur (C). Le nombre de neurones que compte chaque sous-type est indiqué entre parenthèses (Aso et al., 2014a).

Les descriptions anatomiques des KC, des neurones dopaminergiques afférents et des neurones efférents a permis le découpage des CP en modules anatomiques, définis par les projections des neurones dopaminergiques et des neurones efférents. En effet, les dendrites d'un type de neurone efférent donné ne ciblent, la plupart du temps, qu'un seul de ces compartiments, et de la même façon, les axones d'un neurone dopaminergique donné ciblent, le plus souvent, un seul compartiment. On a donc des modules anatomiques recevant des afférences d'un ou deux neurones dopaminergiques, et contactant un ou deux neurones efférents, soulevant la possibilité de modulation des synapses KC-neurones efférents de façon

localisée, spécifiquement par le neurone dopaminergique afférent au module (Aso et al., 2014a).

Une présentation des différents neurones efférents et afférents aux CP, sur la base des modules qu'ils décrivent, est faite en Figure 59, Figure 60 et Figure 61, selon un classement par type de neurotransmetteur utilisé (Glutamate, GABA et Acétylcholine).

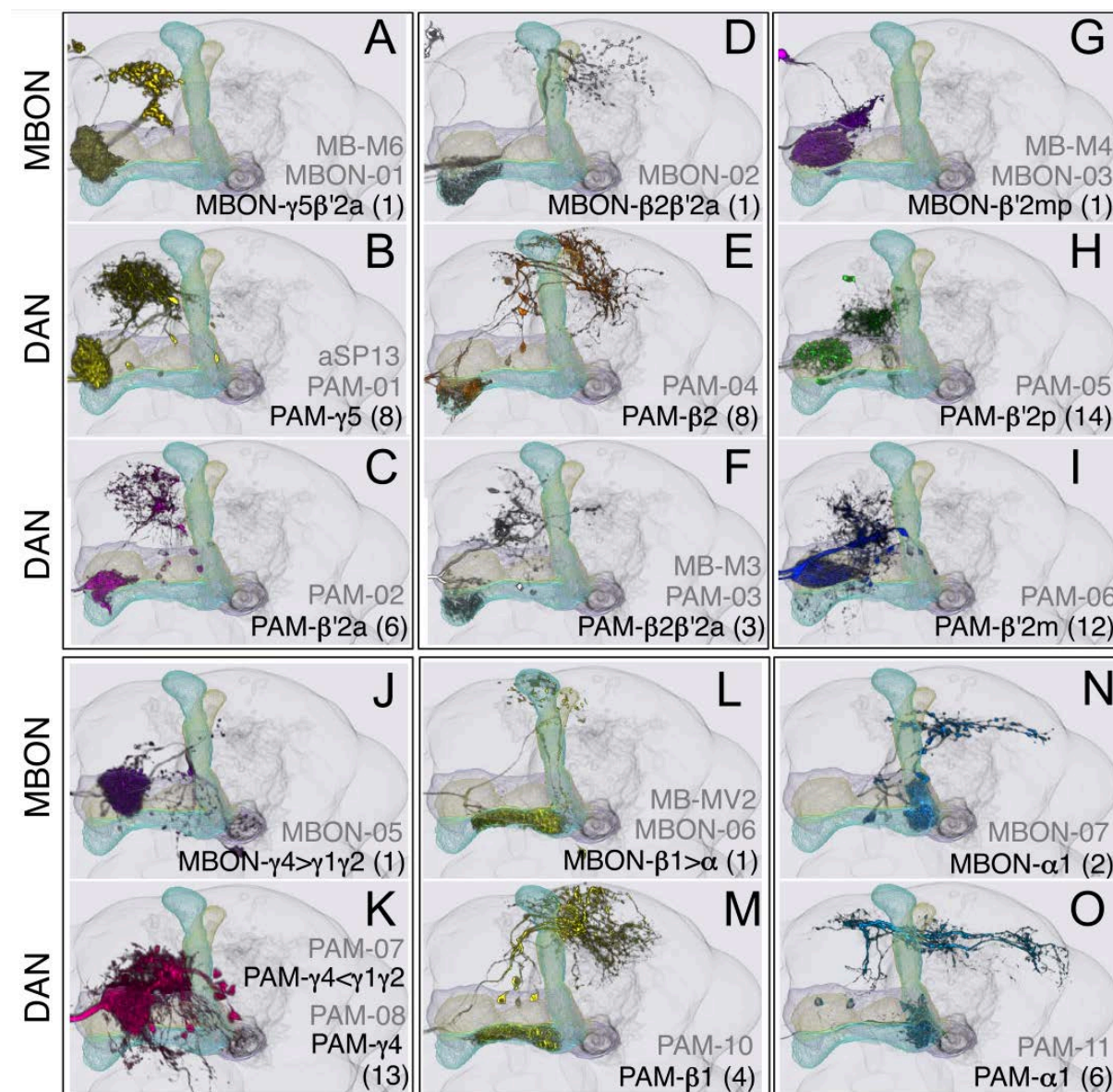


Figure 59 : Présentation des neurones efférents glutamatergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments

Les projections des neurones efférents aux CP (ou MBON en anglais) présentés en (A), (D), (G), (J), (L) et (N) décrivent des modules anatomiques contactés respectivement par les neurones dopaminergiques (ou DAN en anglais)

(B, C), (E, F), (H, I), (K), (M) et (O). Le nombre de neurones que compte chaque sous-type est indiqué entre parenthèses (Aso et al., 2014a)

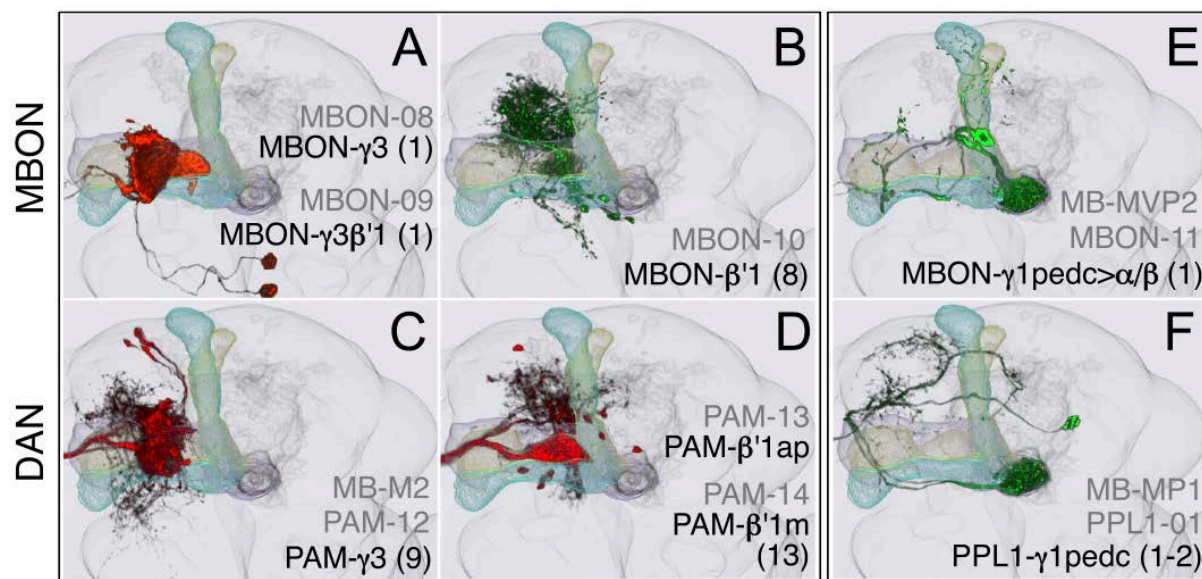


Figure 60 : Présentation des neurones efférents GABAergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments

Les projections des neurones efférents aux CP présentés en (A), (B) et (E) décrivent des modules anatomiques contactés respectivement par les neurones (C), (D) et (F). Le nombre de neurones que compte chaque sous-type est indiqué entre parenthèses (Aso et al., 2014a).

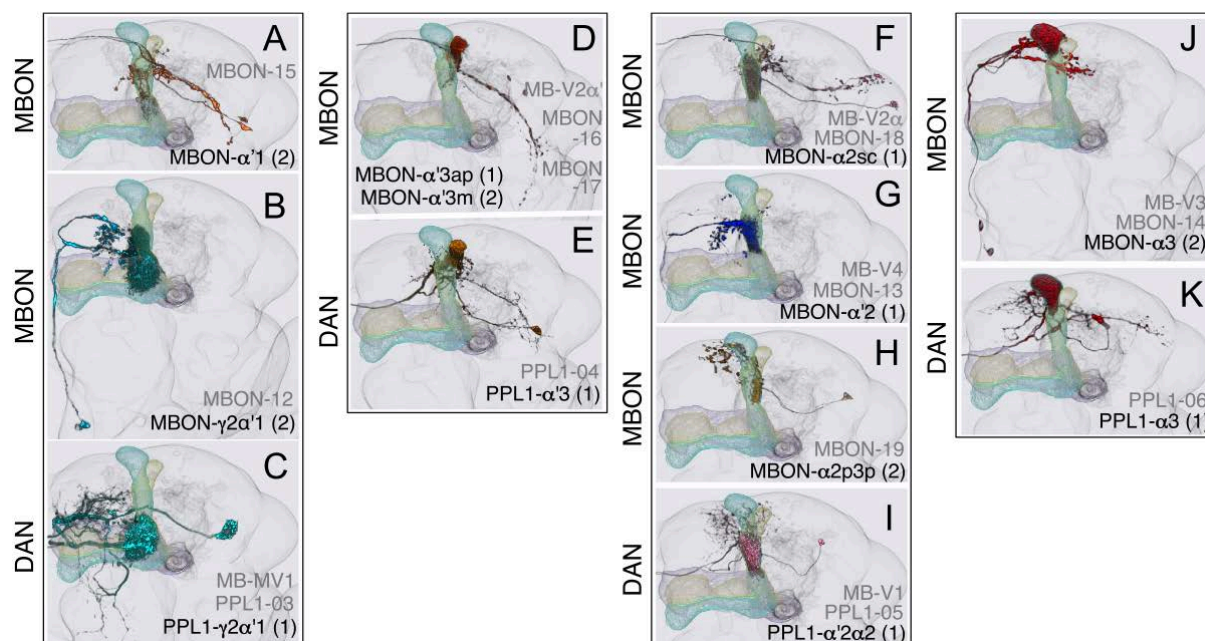


Figure 61 : Présentation des neurones efférents cholinergiques et des neurones dopaminergiques afférents aux mêmes compartiments

Les projections des neurones efférents aux CP présentés en (A, B), (D), (F, G, H) et (J) décrivent des modules anatomiques contactés respectivement par les neurones (C), (E), (I) et (K). Le nombre de neurones que compte chaque sous-type est indiqué entre parenthèses (Aso et al., 2014a).

1.1.2 Stratégie employée pour l'identification systématique des neurones du rappel des MLT

Notre participation au projet s'est basée sur une volonté d'identification exhaustive des neurones du rappel, tant pour les KC que pour les neurones qui leur sont afférents et efférents. J'ai donc initialement pris en charge l'étude de la MLT aversive tandis qu'Eric Le Glou, un ancien post-doctorant de notre équipe, s'est attaché à l'étude de la MLT appétitive. Cependant, j'ai également terminé l'étude de la MLT appétitive après le départ d'Eric.

Pour identifier les types neuronaux requis pour le rappel de la MLT, nous avons utilisé la technique de blocage par la protéine Shibire^{ts} qui est bien maîtrisée au laboratoire depuis plusieurs années. Néanmoins, nos collaborateurs à JFRC avaient réalisées leurs caractérisations anatomiques grâce à l'expression de la GFP dans une construction génétique précise (vecteur comportant 10 séquences UAS en tandem, et avec comme site d'insertion VK00005 sur le chromosome III). Ils ont donc choisi d'utiliser, pour toutes les approches comportementales, l'effecteur Shibire^{ts} construit de manière similaire (point d'insertion et nombre de séquences UAS) afin de maximiser les chances que les patrons d'expression de la GFP et de Shibire^{ts} soient identiques. Notons cependant que l'UAS-Shi a été homogénéisé sur un fond génétique Canton S, ce qui n'était pas le cas pour la lignée UAS-mCD8::GFP utilisée pour la caractérisation anatomique. Nous appellerons ici cette version de l'effecteur UAS-Shi_{JFRC}, par opposition à la version habituellement employée dans notre laboratoire (une copie du transgène UAS-Shi^{ts} (Kitamoto, 2001) insérée en un site indéterminé du chromosome 3), que nous appellerons UAS-Shi_{GDSM}.

Nous avons décidé de suivre une approche en deux temps. Tout d'abord une première étape de criblage devait permettre de proposer des types neuronaux candidats. Chacune des lignées Split-Gal4 a été croisée à UAS-Shi_{JFRC}. Pour les géotypes Split-Gal4/UAS-Shi_{JFRC}, la protéine Shibire^{ts} est exprimée dans le type neuronal d'intérêt et permet son blocage au moment du rappel mnésique par un passage à température restrictive. Pour être plus efficaces et étant donné l'ampleur de ces cribles comportementaux, nous avons dans un premier temps utilisé un seul géotype contrôle, commun à toutes les lignées, le géotype +/- UAS-Shi_{JFRC}, et omis l'autre géotype contrôle Split-Gal4/+. Les 80 lignées ont été testées en aveugle et nous

avons choisi d'atteindre pour chaque lignée un « n » entre 8 et 12, plage dans laquelle on estime, d'après notre expérience de cet outil, atteindre la significativité quand un défaut doit être obtenu. Pour l'analyse statistique, le pool pour chaque lignée est comparé en T-test au pool de +/UAS-Shi_{JFRC}, en appliquant une correction de Benjamini-Hochberg pour prendre en compte les comparaisons multiples avec un seul contrôle en commun (cf Matériel et Méthodes). Les lignées avec un défaut significatif sont des « hits » potentiels.

La première étape permettant seulement de proposer des types neuronaux candidats, il était nécessaire d'effectuer une étape de confirmation, afin d'éviter les faux positifs. Nous avons donc procédé aux contrôles suivants, pour les lignées correspondant aux types cellulaires candidats :

1) re-test à température restrictive (lors du rappel) avec les deux contrôles génotypiques (Split-Gal4/+ et +/UAS-Shi_{JFRC}). Cela permet de s'assurer que le défaut de mémoire est spécifique du génotype d'intérêt, c'est à dire que n'étant pas retrouvé chez le Split-Gal4/+, il n'est pas imputable au fond génétique Split-Gal4.

2) contrôle à température permissive, pour s'assurer que l'expression de Shibire^{ts} dans les neurones n'a pas d'effet délétère en soi, et que c'est bien le blocage de la neurotransmission qui est à l'origine du défaut observé.

3) dans le cas de la MLT appétitive : contrôle de l'acuité olfactive à jeun, afin de vérifier que dans les conditions du test de rappel mnésique les drosophiles sont bien capables de discerner les deux odeurs.

4) dans le cas de la MLT appétitive, un contrôle de réponse au sucre permet d'être certain que le défaut ne découle pas d'une absence de motivation pour la nourriture lors du test de rappel.

Au final, nous avons décidé que nous pourrions conclure à l'implication d'un type cellulaire si et seulement si deux lignées le marquant passaient toutes les étapes de contrôle. Néanmoins, dans le cas de types cellulaires déjà publiés, une seule lignée était suffisante.

I.1.3 Identification systématique des neurones requis dans le rappel de la MLT aversive

I.1.3.1 Types neuronaux candidats suite au criblage initial pour le rappel de la MLT aversive

Comme le montre la Figure 62, parmi les 80 lignées testées, seules 12 ont présenté un défaut de MLT aversive significatif.

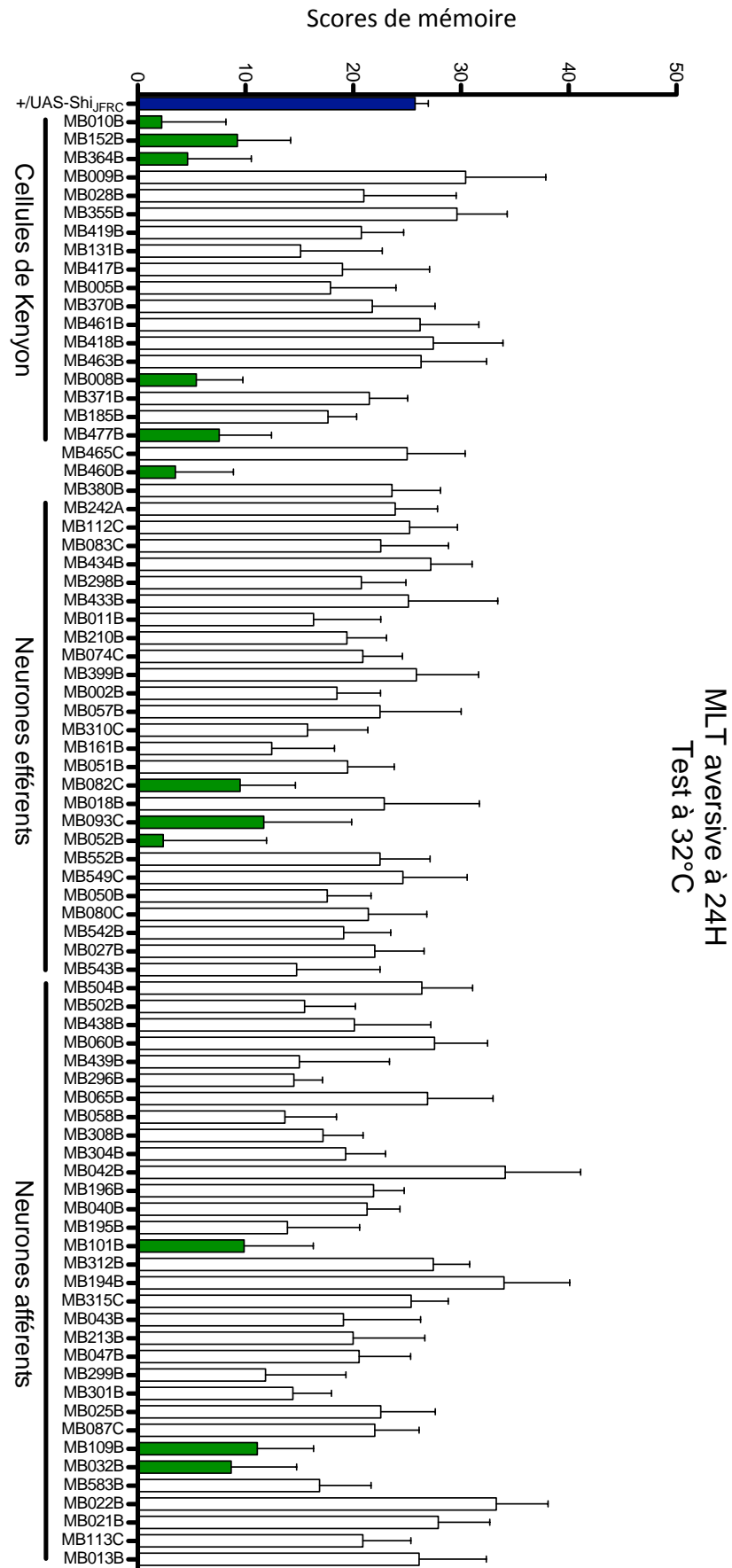


Figure 62 : Vue d'ensemble du criblage initial pour la MLT aversive

Le génotype contrôle +/UAS-Shi_{JFRC} est présenté à gauche (bleu). Ensuite viennent les lignées testées, les lignées marquées en vert étant celles dont le défaut a été significatif (à $p < 0,05$) en t-test après correction de Benjamini-Hochberg ($n=8-10$ pour chaque lignée sauf pour +/UAS-Shi_{JFRC} où $n=157$).

Si l'on examine en particulier les lignées correspondant aux KC (Figure 63), on observe que toutes les lignées marquant les KC α/β , sauf trois (MB417B, MB371B et MB185B), présentent un défaut de mémoire. L'hypothèse minimale ressortant de ces données est que les KC α/β sont impliquées dans le rappel de la MLT. L'absence de défaut pour les lignées MB417B et MB185B risque de relever de faux négatifs, étant donné que les marquages de ces lignées sont récapitulés, respectivement, dans MB010B et MB477B présentant, elles, un défaut. L'absence de défaut dans MB371B n'est pas contradictoire avec le reste des données, puisque c'est la seule à marquer une si petite fraction des KC.

Pour confirmer l'implication de ce type cellulaire, dont l'implication était déjà documentée (Huang et al., 2013; Isabel et al., 2004), nous avons choisi de réaliser l'étape de confirmation avec la lignée MB008B, mais également les lignées MB477B afin de confirmer éventuellement que bloquer moins de la totalité des KC α/β (soit deux des quatre sous-types de KC) est suffisant pour altérer le rappel de la MLT aversive. Nous avons en outre obtenu à ce stade une nouvelle lignée, MB594B, permettant de marquer spécifiquement les KC α/β cœur, et lui avons appliqué la procédure de confirmation.

Nom de la lignée	Cellules de Kenyon									Défaut de mémoire
	KCyd	Kcymain	KCa'/β'a	KCa'/β'm	KCa'/β'p	KCa'/β'p	KCa'/β's	KCa'/β'o	KCa'/β'l	
MB010B	3	3								oui
MB152B	3	3				1	3	1	1	oui
MB364B						3			1	oui
MB009B	2	2								
MB028B	2									
MB355B	3	1								
MB419B										
MB131B	3	4								
MB417B							2	2		
MB005B			4	4	4					
MB370B					2					
MB461B				4						
MB418B										
MB463B				3	4					
MB008B								4		oui
MB371B										
MB185B								3		
MB477B								2		oui

Figure 63 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les Cellules de Kenyon

19 lignées marquent les KC et permettent différents patrons d'expression parmi les 9 sous-types de KC. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage initial ($p < 0,05$ en t-test après correction de Benjamini-Hochberg).

En ce qui concerne l'analyse du criblage initial quant aux neurones efférents (ou *Output*) (Figure 64), quatre lignées présentent un défaut et proposent des types cellulaires candidats : la lignée MB460B qui marque les neurones DAL, les lignées MB082C et MB093C marquant les neurones MB-V3 (ou neurones *Output* α 3) et MB-V4 (ou neurones *Output* α '2), et la lignée MB052B marquant les MB-V2 (ou neurones *Output* α 2 et α '3). Nous avons décidé d'appliquer l'étape de confirmation à ces quatre lignées.

Nom de la lignée	Neurones efférents aux CP																	Défaut de mémoire							
	DPM	CSD	APL	DGI/DAL	MB-C1	Outputcalyx(CP1)	outputy1(MVP2)	outputy3β'1	outputy4->y12	Outputβ1(MV2)	outputy5β'2a(M6)	outputβ2 β'2a	Outputβ'2mp(M4)	outputβ'1	outputα1	outputy2α'1	outputα'2(V4)		outputα3(V3)	outputα2(V2asc)	outputα2(V2α2p)	outputα'3p(V2α'3p)	outputα'3m(V2α'3m)	outputα'3a(V2α'3a)	outputα'1(V2α'1)
MB465C	3																								
MB460B			4																						oui
MB380B				4																					
MB242A					4																				
MB112C						4																			
MB083C							4																		
MB434B								4	4																
MB298B								4																	
MB433B									1	3															
MB011B										4		3													
MB210B											4														
MB074C										2	2	4													
MB399B											2														
MB002B										2		4													
MB057B													3												
MB310C														4	1										
MB077B															4	1									
MB051B																4	1								
MB082C																	3	4							oui
MB018B																	4								
MB093C																	2	4							oui
MB052B																		4	2	2	2	2	2	2	oui
MB552B																		2	2	2		2			
MB549C																		3				4			
MB050B																							2		
MB080C																		2							
MB542B																			2	2	2				
MB027B																									
MB543B																						2	2	3	

Figure 64 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les neurones efférents aux CP

29 lignées marquent différents ensembles parmi 22 types de neurones efférents. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage initial ($p < 0,05$ en t -test après correction de Benjamini-Hochberg).

Enfin, parmi les neurones afférents aux CP, seules trois lignées marquant différents ensemble de neurones dopaminergiques du cluster PAM présentent un défaut (Figure 65).

Cependant, on remarque des contradictions internes : MB316B présente un défaut alors que MB047B non, MB032B présente un défaut et pas MB042B. Ces incohérences nous ont laissé penser que l'on avait affaire à des faux positifs. Afin de progresser plus rapidement, et compte tenu d'incohérences similaires dans les criblages comportementaux menés par les

autres laboratoires, il a été décidé de focaliser l'étude sur les neurones des CP et sur les neurones efférents à l'issue du primo-criblage, de façon commune à toutes les équipes de recherche impliquées dans les cribles comportementaux.

Nom de la lignée	Neurones dopaminergiques														Neurones octopaminergiques					Pars Intercrebralis	Défaut de mémoire					
	PPL1				PAM																					
	PPL1MP1	PPL1 v2α1 (MV1)	PPL1α12α2 (MB-V1)	PPL1α3	PPL1α3	PPL1v1	PAMv12-v4	PAMv3	PAMv4	PAMv5 (β'2a)	PAMB1(MVP1)	PAM β1p ped	PAMα1(MVP1)	PAMB2sp(M3)	PAMB2cp	PAMB'1	PAMB'2a	PAMB'2m	PAMB'2p & β'2mp	DA PPL2ab (6)	OA-VUMa2	OA-VPm3	OA-VPm4	OA-VPm5		
MB504B	3	4	4	2																						
MB502B	3			3	3																					
MB438B	4			2	1																					
MB060B			4	4	2																					
MB439B		4	2	1																						
MB296B		3																								
MB065B		3	3	4	1																					
MB058B																										
MB308B				1	4																					
MB304B					3																					
MB042B							1	2	3	1	1		1		0	0	0	1	2							
MB196B							1	1	1	2	1		1				1	2								
MB040B							0	2	3	4	0		2		1	2	0	2	1							
MB195B								2																		
MB316B							0	2										1								oui
MB312B							1	2																		
MB194B							1		1	4	2	2		2	1	1										
MB315C																										
MB043B										3																
MB213B										3		1		4												
MB047B								1		1		1						2								
MB299B									1		2		1	1												
MB301B													1					1								
MB025B																										
MB087C																		1								
MB109B									1									5								oui
MB032B							1		0					0				1								oui
MB583B																					3					
MB022B																							4	4		
MB021B																								2		
MB113C																								4		
MB013B																									4	

Figure 65 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT aversive pour les lignées marquant les neurones afférents aux CP

32 lignées marquent différents ensembles parmi 25 types de neurones efférents. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage initial ($p < 0,05$ en t -test après correction de Benjamini-Hochberg).

I.1.3.2 Confirmation de l'implication des types neuronaux candidats pour le rappel de la MLT aversive

Parmi les lignées sélectionnées pour confirmation, certaines ont pu passer avec succès les différents tests, c'est à dire qu'elles ont confirmé un défaut en condition de test à température restrictive avec tous les contrôles génotypiques et qu'elle n'ont pas présenté de défaut avec un test effectué à température permissive avec tous les contrôles génotypiques.

Ainsi, nous avons obtenu la confirmation de l'implication des KC α/β , grâce à la lignée MB008B (Figure 66).

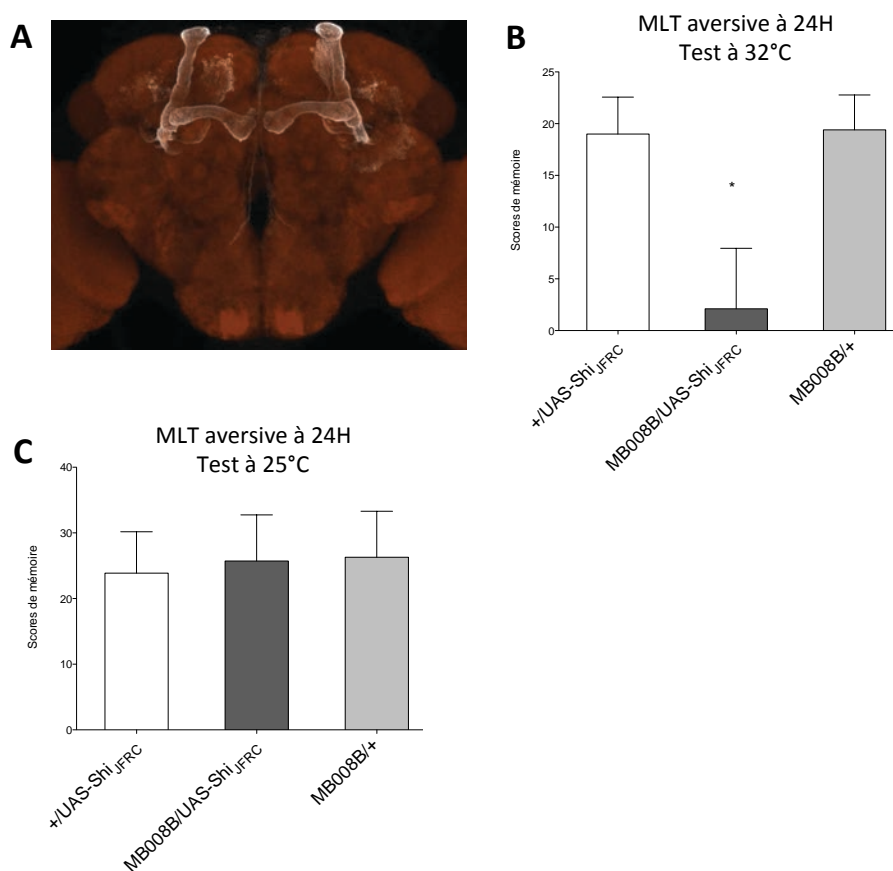


Figure 66 : Les Cellules de Kenyon α/β sont impliquées lors du rappel de la MLT aversive

*MB008B/GFP révèle un marquage spécifique des KC α/β (A). Avec le test effectué à température restrictive, MB008B/UAS-Shi_{JFRC} présente un défaut de MLT aversive ($p_{ANOVA}=0,0151$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=8-10$)(B). Aucun défaut n'est observable à température permissive ($p_{ANOVA}=0,9647$, $n=8$)(C) (scores en %).*

Par contre, les autres lignées ciblant les KC α/β , mais en marquant seulement une partie, ont échoué lors de l'étape de confirmation : il s'agit de MB477B (KC α/β surface et *cœur externe*) et MB594B (KC α/β cœur) (Figure 67). Cela indique donc que le blocage des sous-populations des KC α/β marquées n'est pas suffisant pour affecter significativement la MLT.

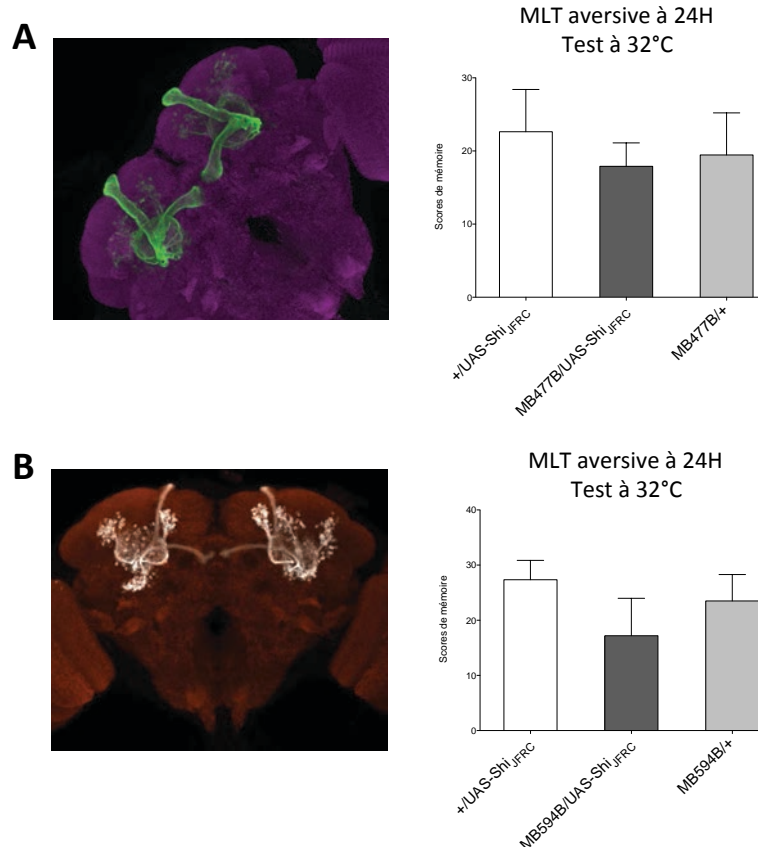


Figure 67 : Deux lignées Split-Gal4 marquant une sous-partie des KC α/β n'ont pas présenté de défaut

Les lignées candidates MB477B (marquant les KC α/β surface et cœur externe) (A) et MB594B (marquant les KC α/β cœur interne et externe)(B) n'ont pas présenté de défaut lors du re-test à température restrictive relativement aux deux contrôles génotypiques ($p_{ANOVA}=0,8105$ et $0,3635$ respectivement, $n=8-11$ et $14-17$ respectivement) (scores en %).

Par ailleurs, nous avons également obtenu la confirmation de l'implication des neurones efférents MB-V2 α (neurones *Output* α 2) et MB-V2 α' (neurones *Output* α' 3), grâce à la lignée MB052B (Figure 68).

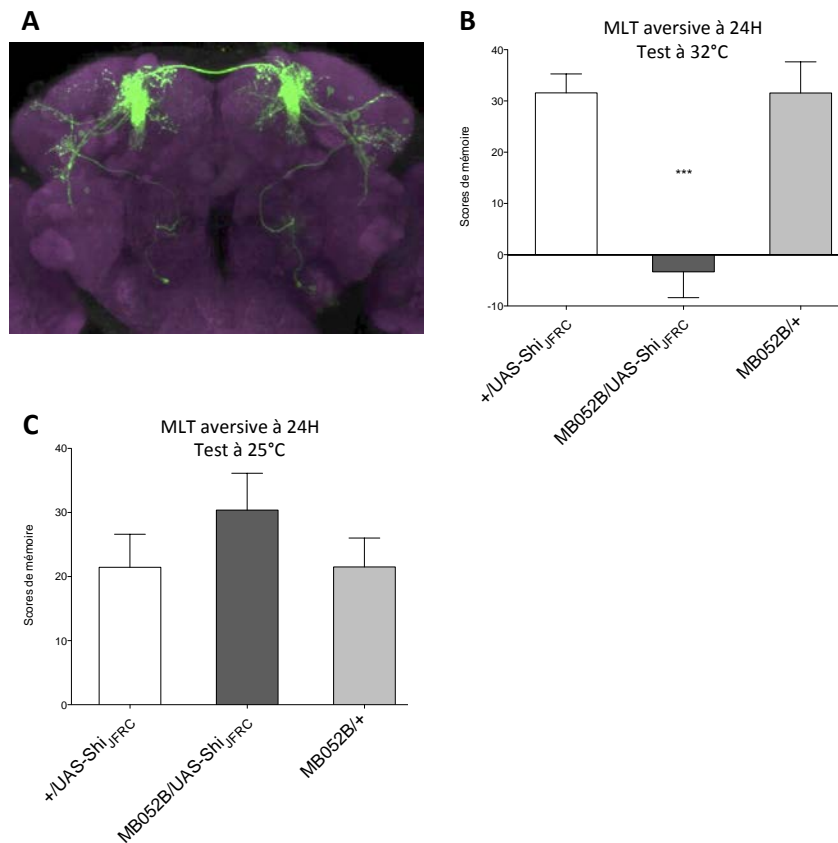


Figure 68 : Les MB-V2 sont impliqués dans le rappel de la MLT aversive

*MB052B/GFP révèle un marquage intégral du cluster MB-V2, soit les neurones MB-V2 α (neurones Output α 2) et MB-V2 α' (neurones Output α' 3)(A). Le re-test à température restrictive confirme le défaut de mémoire proposé par le criblage initial ($p_{ANOVA} < 0,0001$, $***p_{POST-HOC} < 0,001$, $n=9-14$)(B). A température permissive, aucun défaut de mémoire n'est observable ($p_{ANOVA} = 0,3963$, $n=8-9$) (C) (scores en %).*

Cependant, nous venons de confirmer que le rappel de la MLT dépend des KC α/β uniquement. On peut alors se demander si les MB-V2 α' , efférents aux lobes α' , sont réellement requis comme le suggère le fait que nous n'obtenions de défaut qu'avec MB052B marquant MB-V2 α et MB-V2 α' . Pour répondre à cette question, l'équipe de Gerald Rubin nous a proposé une lignée supplémentaire Triple-Split 65B09;MB062C. Grâce à la conjonction de deux héli-splits « AD » pour l'activation de la transcription et d'un héli-split « dbd » pour la reconnaissance de la séquence UAS, la protéine Gal4 est reconstituée selon deux intersections différentes. Le patron étendu ainsi créé permet de marquer de façon certaine tous les MB-V2 α . Cependant, cette lignée n'a pas présenté de défaut de rappel de MLT en condition de blocage pendant le rappel, ne permettant pas de lever l'ambiguïté (Figure 69).

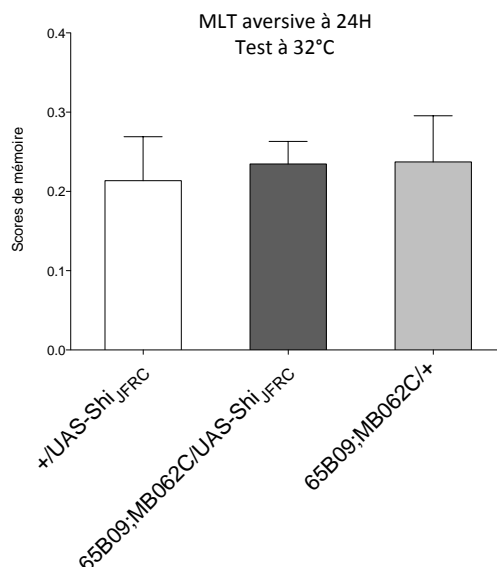


Figure 69 : Le blocage des MB-V2 α seuls ne semble pas suffire à induire un défaut de MLT aversive

La lignée 65B09 ;MB062C comprend 3 héli-Splits Gal4, permettant de cibler la totalité des MB-V2 α . Le blocage de ces neurones pendant le rappel de la MLT aversive ne permet pas d'induire un défaut ($p_{ANOVA}=0,9334$, $n=11$).

Par ailleurs, la lignée MB082C marquant les MB-V4 (neurones *Output* $\alpha'2$) et MB-V3 (neurones *Output* $\alpha3$) a également été confirmée en test à 32°C. Le contrôle en test à 25°C n'a présenté aucun défaut, de même que l'olfaction à 32°C (Figure 70). Ce résultat reste néanmoins douteux, compte tenu de plusieurs points. Tout d'abord, la lignée MB093C ne présente, elle, pas de défaut lors du re-test à température restrictive (Figure 70 F), alors qu'elle présente le même marquage que MB082C.

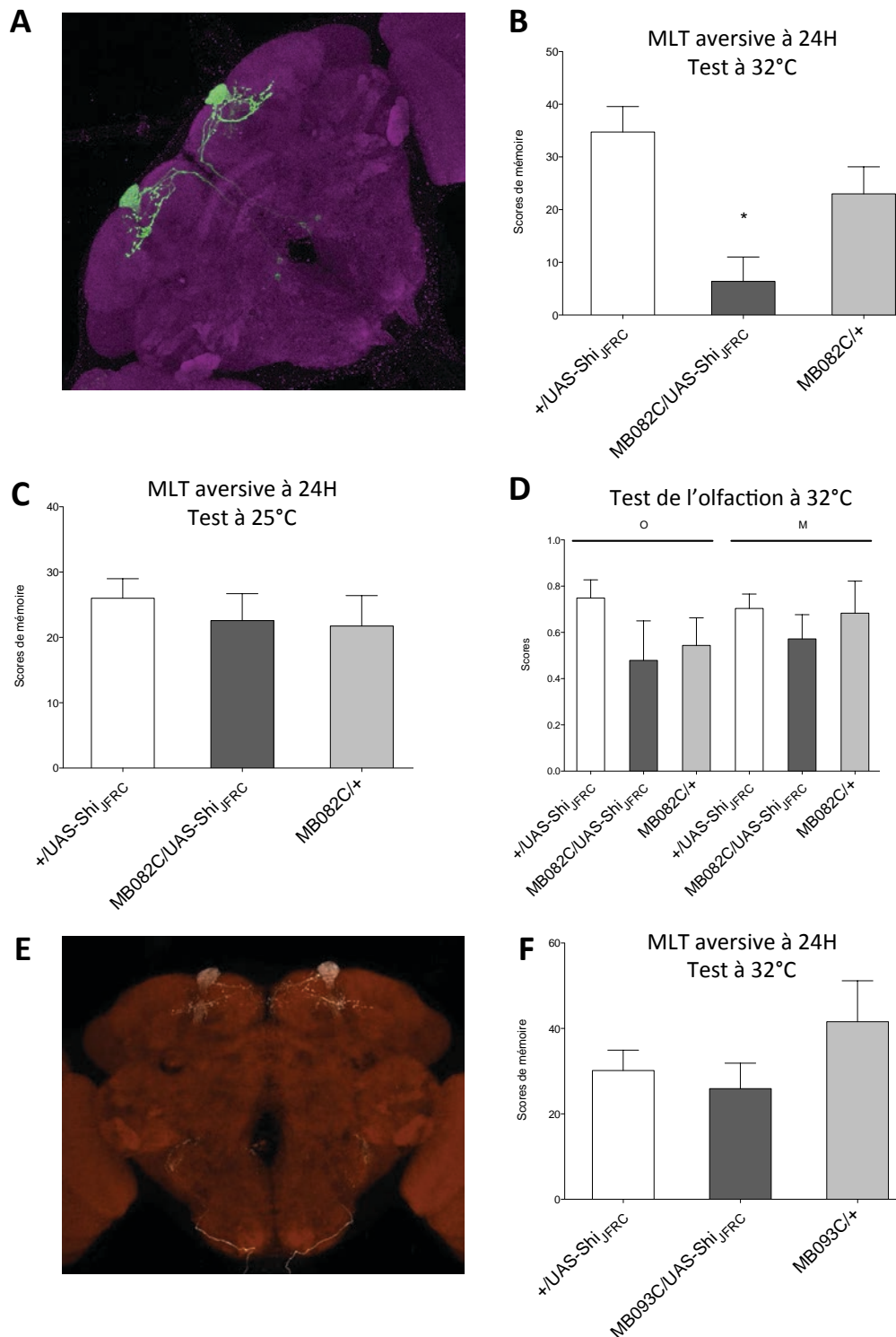


Figure 70 : Le cluster MB-V3/MB-V4 est l'objet de discordances dans le cadre du rappel de la MLT aversive

La lignée MB082C marque les neurones MB-V4 (neurones Output $\alpha'2$) et MB-V3 (neurones Output $\alpha3$), comme le révèle l'expression de la GFP via ce pilote (A). Un défaut de mémoire est observable à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0015$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=11-12$) (scores en %) (B). La mémoire est normale à température permissive ($p_{ANOVA}=0,7409$, $n=11-12$) (scores en %) (C).

L'olfaction est normale à température restrictive (Pour O, $p_{ANOVA}=0,3212$ et pour M, $p_{ANOVA}=0,6511$, $n=8$ et 6 respectivement) (D). La lignée MB093C marque également les neurones MB-V4 et MB-V3 (E), mais ne présente aucun défaut de mémoire en condition de blocage pendant le rappel de la MLT aversive ($p_{ANOVA}=0,2871$, $n=11-13$) (F).

D'autre part, la lignée MB082C présente également un défaut de MRA à 24 heures (Figure 71 A), alors qu'il est documenté qu'aucune lignée marquant les MB-V3 et/ou les MB-V4 n'induit de défaut de MRA à 24 heures (Pai et al., 2013; Plaçais et al., 2013).

Enfin, les deux lignées Gal4 ayant conduit aux « héli-split » utilisés pour construire MB082C, 40B08-Gal4 et 23C06-Gal4, ne présentent pas de défaut (Figure 71 B et C), alors que leurs marquages incluent, par définition, celui de MB082C. Nous pensons donc que le défaut de rappel de MLT de MB082C est un faux-positif, identifié pour une raison pour l'instant non résolue.

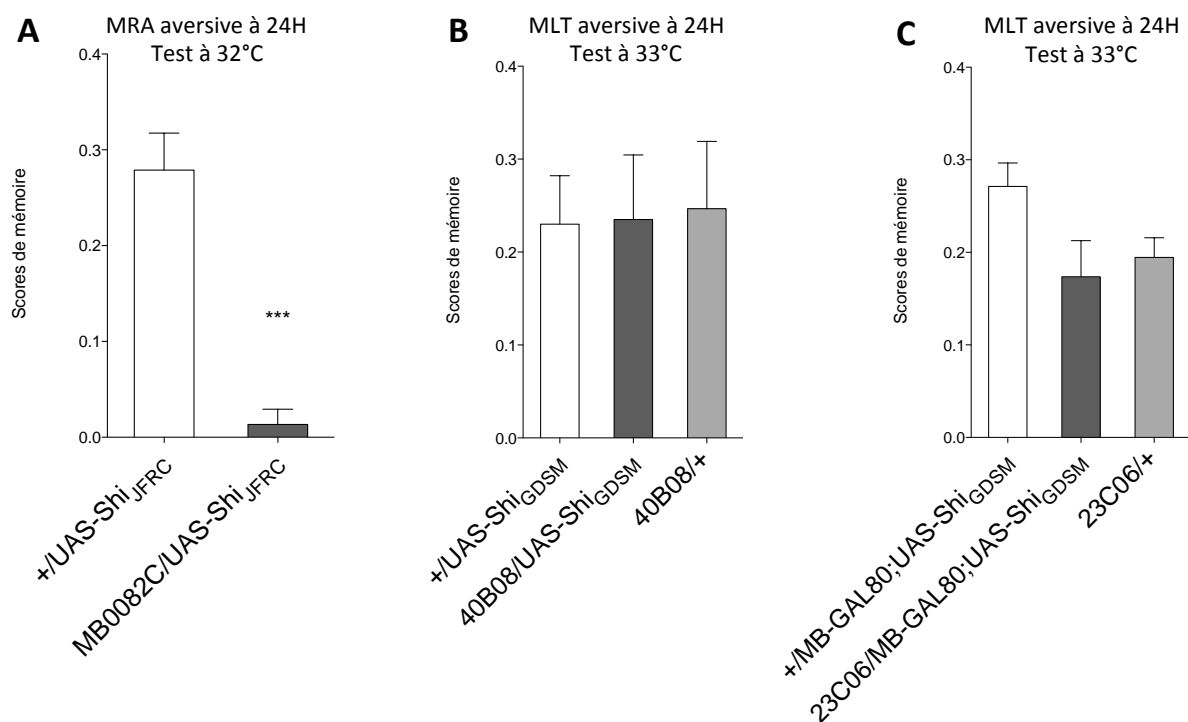


Figure 71 : Expériences complémentaires relatives à l'implication de cluster MB-V3/MB-V4 dans le rappel de la MLT aversive

La lignée MB082C présente a priori, l'expérience ayant été exceptionnellement réalisée sans le contrôle Split-Gal4/+, un défaut de MRA à 24H en test à température restrictive ($***p_{T-TEST}<0,001$, $n=9$)(A). Par ailleurs, les lignées 40B08 et 23C06, ayant servi à la construction de la lignée MB082C, ne présentent individuellement pas de défaut de rappel de MLT aversive ($p_{ANOVA}=0,9830$ et $0,0579$ respectivement ; $n=6$ et 16 respectivement)(B et C).

Enfin, nous avons procédé au re-test de la lignée MB460B marquant les neurones DAL. Ici aussi, le défaut ne s'est pas confirmé (Figure 72 A). Cela induisant une contradiction avec la littérature (Chen et al., 2012), nous avons recherché si la lignée utilisée dans l'article en question présentait tout de même le défaut publié. Cependant, aucun défaut de rappel de la MLT n'a pu être décelé (Figure 72 B).

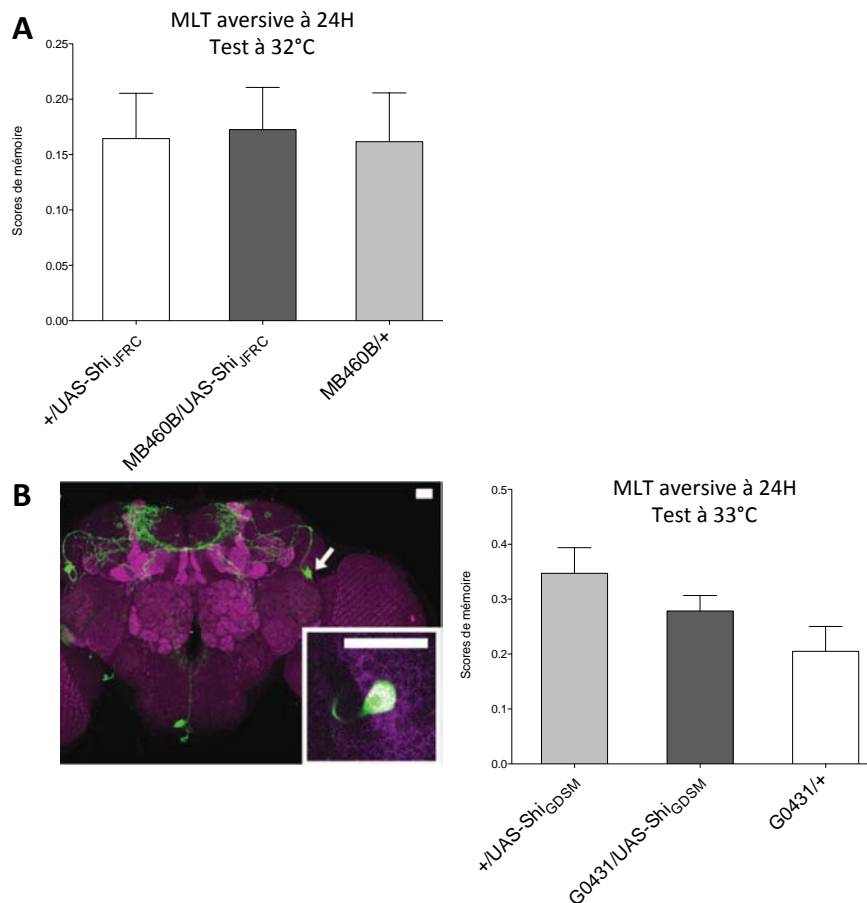


Figure 72 : Les DAL ne sont pas impliqués dans le rappel de la MLT aversive

La lignée Split-Gal4 MB460B (A) et la lignée Gal4 classique G0431 (B), marquant les neurones DAL n'ont pas présenté de défaut en situation de rappel à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,9804$ et $0,0604$ respectivement ; $n=9-12$ et $9-14$ respectivement). Le marquage présenté correspond à l'expression de la GFP via la lignée G0431 (Chen et al., 2012).

En conclusion, nous avons pu confirmer, au minimum, que les neurotransmissions des KC α/β , ainsi que des neurones MB-V2 sont requises lors du rappel de la MLT aversive.

Dans le cadre de notre collaboration avec JFRC, nous avons décidé d'un commun accord d'utiliser seulement les résultats tenant aux neurones efférents pour les intégrer dans l'article final. L'article en question, publié dans la revue E-life, est présenté en annexe et la

partie relative au criblage des neurones efférents aux CP requis pour la MLT aversive se trouve en page 13 et 19 de l'article.

1.1.4 Identification systématique des neurones requis dans le rappel de la MLT appétitive

1.1.4.1 Types neuronaux candidats suite au criblage initial pour le rappel de la MLT appétitive

Quand on s'intéresse aux résultats du criblage initial de la MLT appétitive (Figure 73), on peut s'apercevoir que près de la moitié des lignées présente un défaut (38 sur 80). En l'occurrence, nous avons considéré significatif un défaut quand la p-value après correction de Benjamini-Hochberg était inférieure à 0,01 pour augmenter encore le niveau de stringence et minimiser les faux-positifs. Ainsi, à première vue, cela laisse envisager que le rappel de la MLT requiert beaucoup plus de neurones que celui de la MLT aversive, ouvrant la perspective de réseaux bien différents pour les deux types de MLT. Une alternative à envisager est que ce paradigme de mémoire appétitive soit plus sensible aux variations expérimentales, en particulier le fond génétique des lignées.

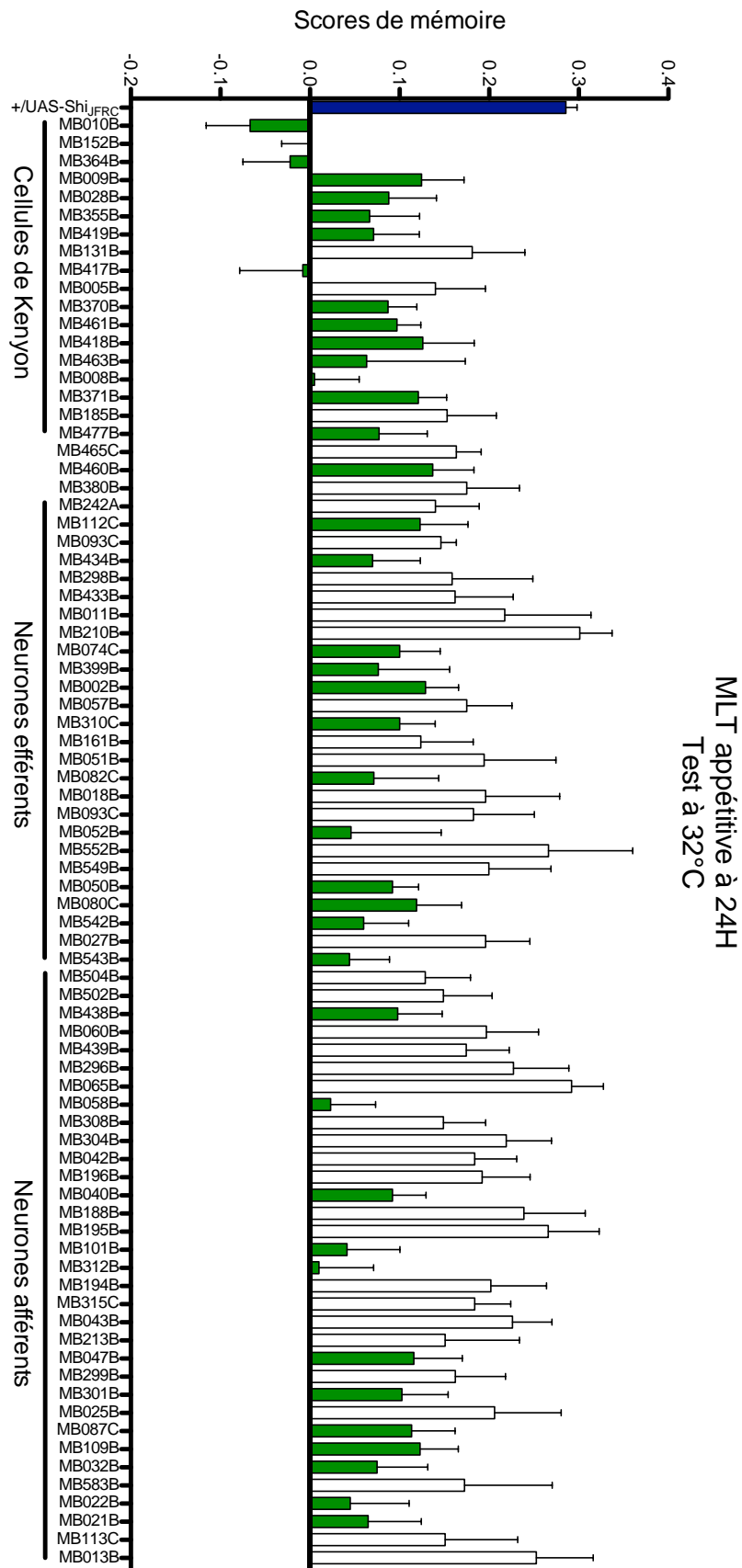


Figure 73 : Vue d'ensemble du criblage initial pour le rappel de la MLT appétitive

Le génotype contrôle +/UAS-Shi_{JFRC} est présenté à gauche (bleu). Ensuite viennent les lignées testées, les lignées marquées en vert étant celles dont le défaut a été significatif (à $p < 0,01$) en t-test après correction de Benjamini-Hochberg ($n = 8-10$ pour chaque lignée, sauf +/UAS-Shi_{JFRC} où $n=169$).

En regardant plus en détail l'implication des différentes populations de KC (Figure 74), on s'aperçoit que quasiment toutes les lignées présentent un défaut. Cela nous pousse à supposer que les trois types de KC (α/β , α'/β' et γ) sont requis pour le rappel de la MLT appétitive, contrairement à ce qui avait été publié jusque là (Cervantes-Sandoval et al., 2013; Krashes and Waddell, 2008; Trannoy et al., 2011). Nous avons donc décidé de tester, pour l'étape de confirmation, au moins deux lignées pour les KC γ , MB028B et MB419B, deux lignées pour les KC α'/β' , MB370B et MB418B, et trois lignées pour les α/β , dans le but de départager l'implication des différents sous-types, MB008B, MB371B et MB477B, ainsi qu'une lignée supplémentaire marquant spécifiquement les KC α/β *cœur*, MB594B. Cependant, nous avons renoncé à utiliser la lignée MB028B qui était en mauvaise santé de façon récurrente, mais avons recouru en remplacement à la lignée MB607B, une lignée supplémentaire marquant les KC γ *dorsal* également.

Nom de la lignée	Cellules de Kenyon								Défaut de mémoire
	KCyd	Kcymain	KCa'/β'a	KCa'/β'm	KCa'/β'p	KCa'/β's	KCa'/βc(o)	KCa'/βc(i)	
MB010B	3	3							oui
MB152B	3	3			1	3	1	1	oui
MB364B					3			1	oui
MB009B	2	2							oui
MB028B	2								oui
MB355B	3	1							oui
MB419B									oui
MB131B	3	4							
MB417B							2	2	oui
MB005B			4	4	4				
MB370B					2				oui
MB461B				4					oui
MB418B									oui
MB463B				3	4				oui
MB008B								4	oui
MB371B									oui
MB185B								3	
MB477B								2	oui

Figure 74 : Résultat de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les Cellules de Kenyon

Les 19 lignées marquant les KC permettent différents patrons d'expression parmi les 9 sous-types de KC. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage-initial ($p < 0,01$ en t-test après correction de Benjamini-Hochberg).

Quand on considère en détail les résultats tenant aux neurones efférents (ou *Output*) (Figure 75), on observe une nouvelle fois que de nombreux types cellulaires sont proposés comme candidats. Etant donné que jusqu'ici seuls les MB-V3 (neurones *Output* $\alpha 3$) avaient été publiés, cela laissait entrevoir la découverte de nombreux autres types cellulaires également impliqués dans le rappel de la MLT appétitive.

Pour l'étape de confirmation, nous avons choisi de re-tester MB460B (seule lignée marquant les neurones DAL), la lignée MB112C (seule lignée marquant les neurones MVP2), la lignée MB434B, sur l'hypothèse de l'implication des neurones *Output* $\beta 1$ et non des neurones *Output* $\gamma 4 \rightarrow \gamma 12$ (étant donné que MB298B n'a pas de défaut). Ensuite, considérant le défaut de MB074C, MB399B et MB002B et l'absence de défaut de MB011B et MB210B,

nous avons suspecté l'implication des neurones *Output* $\beta_2\beta'2a$, et décidé de re-tester en conséquence les lignées MB074C et MB399B. Nous avons également entrepris de re-tester la lignée MB310C, seule marquant les neurones *Output* α_1 . Qui est plus est, nous avons obtenu un défaut avec la lignée MB082C, marquant notamment les neurones MB-V3, déjà publiés. Nous avons décidé de re-tester cette lignée, mais aussi de vérifier exceptionnellement une lignée qui n'avait pas produit de défaut, la MB093C. Enfin, plusieurs lignées ont proposé un rôle du cluster MB-V2. Nous avons choisi pour l'étape de confirmation les deux lignées que nous évaluions les plus à même de donner à nouveau un défaut : MB542B et MB052B.

Nom de la lignée	Neurones efférents aux CP																	Défaut de mémoire								
	DPM	CSD	APL	DGI/DAL	MB-C1	Outputcalyx(CP1)	outputy1(MVP2)	outputy3β'1	outputy4->y12	Outputβ1(MV2)	outputy5β'2a(M6)	outputβ2 β'2a	Outputβ'2mp(M4)	outputβ'1	outputα1	outputy2α'1	outputα'2(V4)		outputα3(V3)	outputα2(V2asc)	outputα2(V2ap)	outputα'3p(V2α'3p)	outputα'3m(V2α'3m)	outputα'3a(V2α'3a)	outputα'1(V2α'1)	
MB465C	ω																									
MB460B			4																							oui
MB380B				4																						
MB242A																										
MB112C						4																				oui
MB083C																										
MB434B								4	4																	oui
MB298B								4																		
MB433B								1	3																	
MB011B										4				3												
MB210B														4												
MB074C										2	2	4														oui
MB399B											2															oui
MB002B										2		4														oui
MB057B														3												
MB310C																										oui
MB077B															4	1										
MB051B															4	1										
MB082C																	3	4								oui
MB018B																	4									
MB093C																2	4									
MB052B																			4	2	2	2	2	2	2	oui
MB552B																			2	2	2		2			
MB549C																			3				4			
MB050B																								2		oui
MB080C																				2						oui
MB542B																				2	2	2				oui
MB027B																										
MB543B																					2	2		3		oui

Figure 75 : Résultat de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les neurones efférents

Les 29 lignées marquent différents ensembles parmi 22 types de neurones efférents. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage-initial ($p < 0,01$ en t -test après correction de Benjamini-Hochberg).

Enfin, concernant les neurones afférents aux CP (Figure 76), nous avons choisi de ne pas re-tester certaines lignées étant très probablement des faux-positifs : MB438B (son défaut aurait dû être retrouvé chez MB502B), MB058B (MB060B n'ayant pas de défaut), MB040B

et MB032B (MB196B ou MB315C par exemple auraient dû, l'une ou l'autre fournir un défaut), MB301B, MB025B (MB043B n'ayant pas de défaut). Concernant le défaut de MB316B et MB047B, relativement à une suspicion d'implication des neurones PAM $\beta'2a$ et $\beta'2mp$, nous avons décidé de les re-tester. Nous avons également décidé de tester MB087C et MB109B (pour les neurones PAM $\beta'2a$), ainsi que MB021B et MB022B (pour les neurones octopaminergiques).

Nom de la lignée	Neurones dopaminergiques														Neurones octopaminergiques					Défaut de mémoire							
	PPL1				PAM																						
	PPL1MP1	PPL1 V2 α' 1 (MV1)	PPL1 α' 12 α 2 (MB-V1)	PPL1 α 3	PPL1 α '3	PPL1 γ 1	PAM γ 12- γ 4	PAM γ 3	PAM γ 4	PAM γ 5 ($\beta'2a$)	PAM β 1 (MVPI)	PAM β 1p ped	PAM α 1 (MVP1)	PAM β 2sp (M3)	PAM β 2cp	PAM β '1	PAM β '2a	PAM β '2m	PAM β '2p & $\beta'2mp$	DA PPL2ab (6)	OA-VUMa2	OA-VPM3	OA-VPM4	OA-VPM5	Pars Intercerebrais		
MB504B	3	4	4	2																							
MB502B	3		3	3																							
MB438B	4		2	1																						oui	
MB060B		4	4	2																							
MB439B		4	2	1																							
MB296B		3																									
MB065B		3	3	4	1																						
MB058B																										oui	
MB308B				1	4																						
MB304B					3																						
MB042B							1	2	3	1	1		1		0	0	0	1	2								
MB196B							1	1	1	2	1		1			1	2										
MB040B							0	2	3	4	0		2		1	2	0	2	1							oui	
MB195B								2																			
MB316B							0		2									1								oui	
MB312B							1		2																	oui	
MB194B								1		1	4	2	2		2	1	1										
MB315C										4																	
MB043B										3						3											
MB213B										3		1		4													
MB047B								1		1	1	1					2									oui	
MB299B										1	2	1	1														
MB301B												1					1									oui	
MB025B																											
MB087C																	1									oui	
MB109B									1																	oui	
MB032B							1		0					0			1									oui	
MB583B																					3						
MB022B																						4	4			oui	
MB021B																							2			oui	
MB113C																							4				
MB013B																									4		
MB594B																										oui	

Figure 76 : Résultats de l'étape de criblage initial en MLT appétitive pour les lignées marquant les neurones afférents

Les 32 lignées marquent différents ensembles parmi 25 types de neurones efférents. La colonne de droite renseigne quelles lignées ont présenté un défaut lors du criblage-initial ($p < 0,01$ en t -test après correction de Benjamini-Hochberg).

I.1.4.2 Confirmation de l'implication des types neuronaux candidats pour le rappel de la MLT appétitive

Pour la confirmation des types cellulaires requis en MLT appétitive, le nombre de candidats était plus élevé que pour la MLT aversive et la phase de confirmation était d'ampleur conséquente. J'ai repris la suite du travail d'Eric Le Glou (ayant réalisé le criblage initial) pour réaliser les différents re-tests sur les lignées retenues.

La phase de confirmation a donc comporté une expérience de MLT appétitive avec test à température restrictive, une expérience avec test à température permissive, un test de réponse au sucre à température restrictive et un test d'olfaction à jeun et à température restrictive avec dans chaque cas une comparaison du génotype d'intérêt à ses deux contrôles génotypiques. Nous avons généralement mené le test de réponse au sucre en premier, car d'après notre expérience beaucoup de mutants ayant un défaut apparent de mémoire appétitive présentent en fait un défaut de réponse au sucre.

Au final la plupart des lignées ont été écartées en tant que faux-positifs ou pour des défauts non-spécifiques car présentant soit une absence de défaut à température restrictive une fois les deux contrôles génotypiques présents, soit un défaut à température permissive, soit un défaut de réponse au sucre à température restrictive, soit un défaut d'olfaction à température restrictive à jeun. Seules trois lignées ont finalement été confirmées comment présentant des défauts de mémoire appétitive. Le tableau suivant (Figure 77) récapitule les résultats obtenus pour les différentes lignées que nous avons soumises à l'étape de re-test.

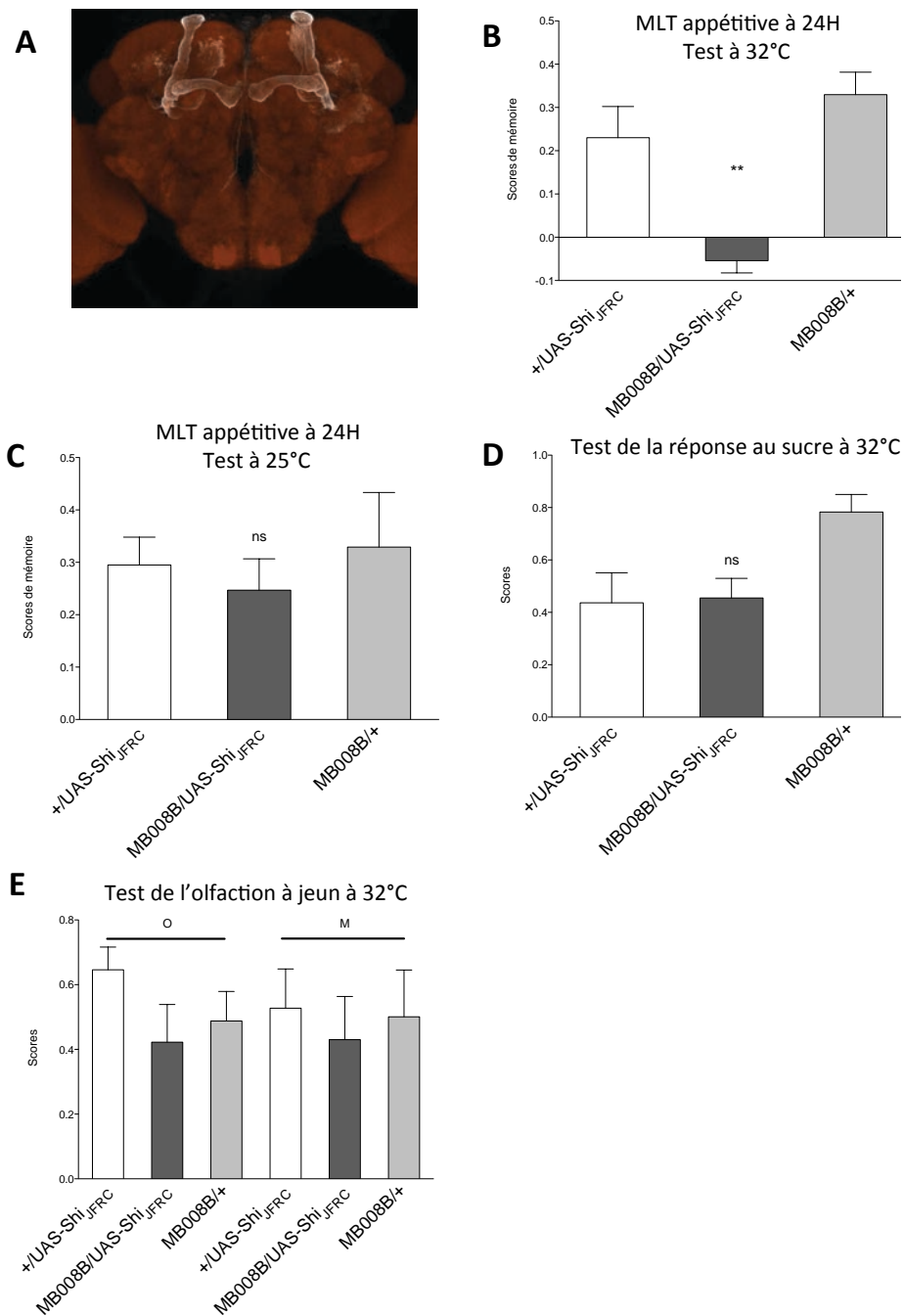


Figure 78 : Les Cellules de Kenyon α/β sont également impliquées dans le rappel de la MLT appétitive

*La lignée MB008B marquant tous les sous-types de KC α/β (A) présente un défaut de MLT appétitive quand le test est à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0002$, $**p_{POST-HOC}<0,01$, $n=8$) (B), mais aucun défaut ni à température permissive ($p_{ANOVA}=0,7344$, $n=9-11$) (C), ni pour la réponse au sucre à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0177$, mais test post-hoc non significatif ; $n=8$) (D), ni pour l'olfaction à jeun à température restrictive (Pour O $p_{ANOVA}=0,2285$, $n=9-10$; pour M $p_{ANOVA}=0,8682$, $n=11$) (E).*

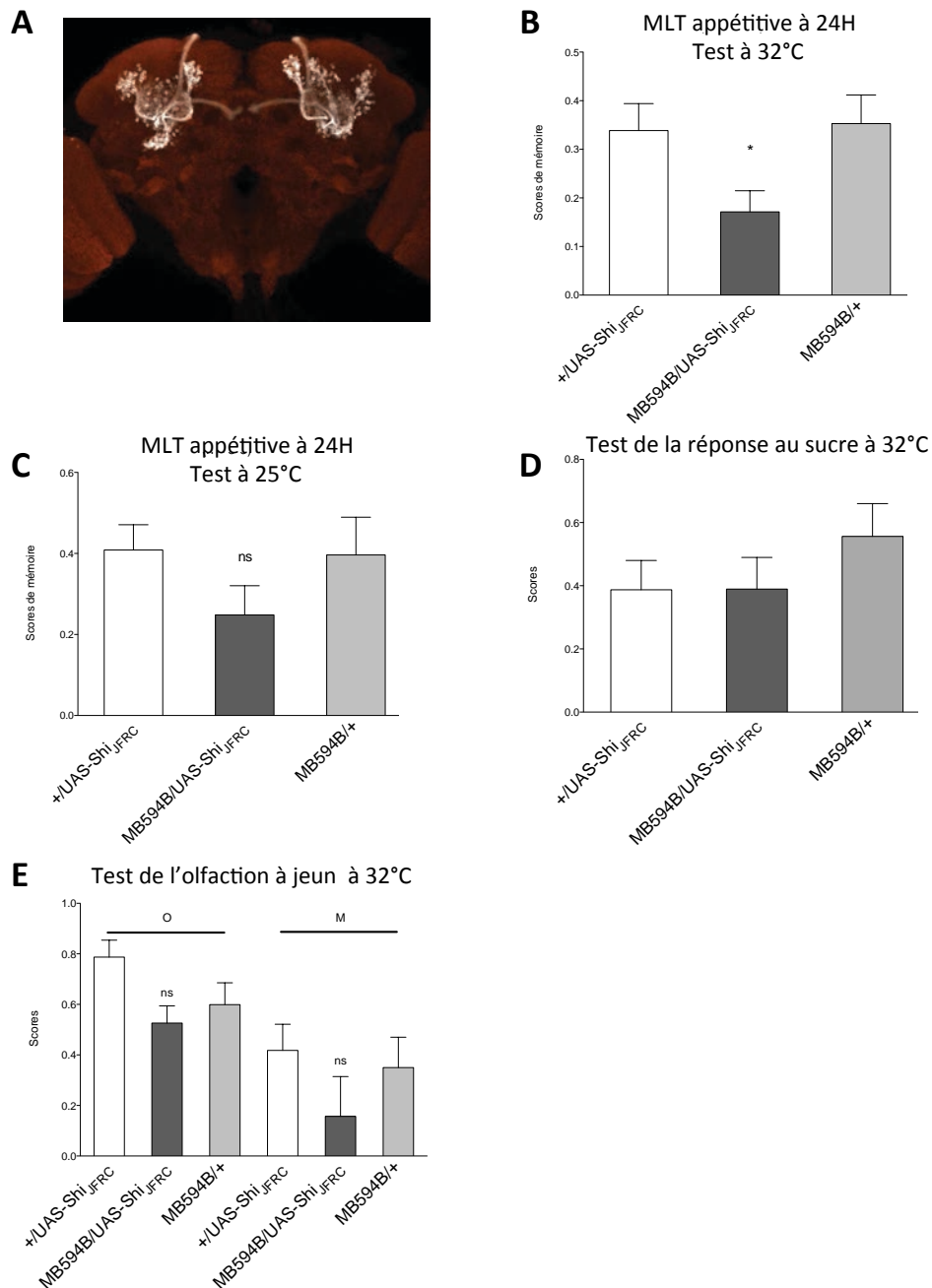


Figure 79 : Les Cellules de Kenyon α/β coeur sont requises lors du rappel de la MLT appétitive

La lignée MB594B marquant les KC α/β coeur spécifiquement (A) présente un défaut de MLT appétitive quand le test est fait à température restrictive ($*p_{POST-HOC} < 0,05$, $n=17-20$) (B), mais pas de défaut significatif à température permissive permissive ($p_{ANOVA} = 0,2629$, $n=8-9$) (C), ni pour la réponse au sucre à température restrictive ($p_{ANOVA} = 0,4401$, $n=6-9$) (D), ni pour l'olfaction à jeun à température restrictive (Pour O, $p_{ANOVA} = 0,0529$, $n=10$; pour M $p_{ANOVA} = 0,3465$, $n=6-9$) (E).

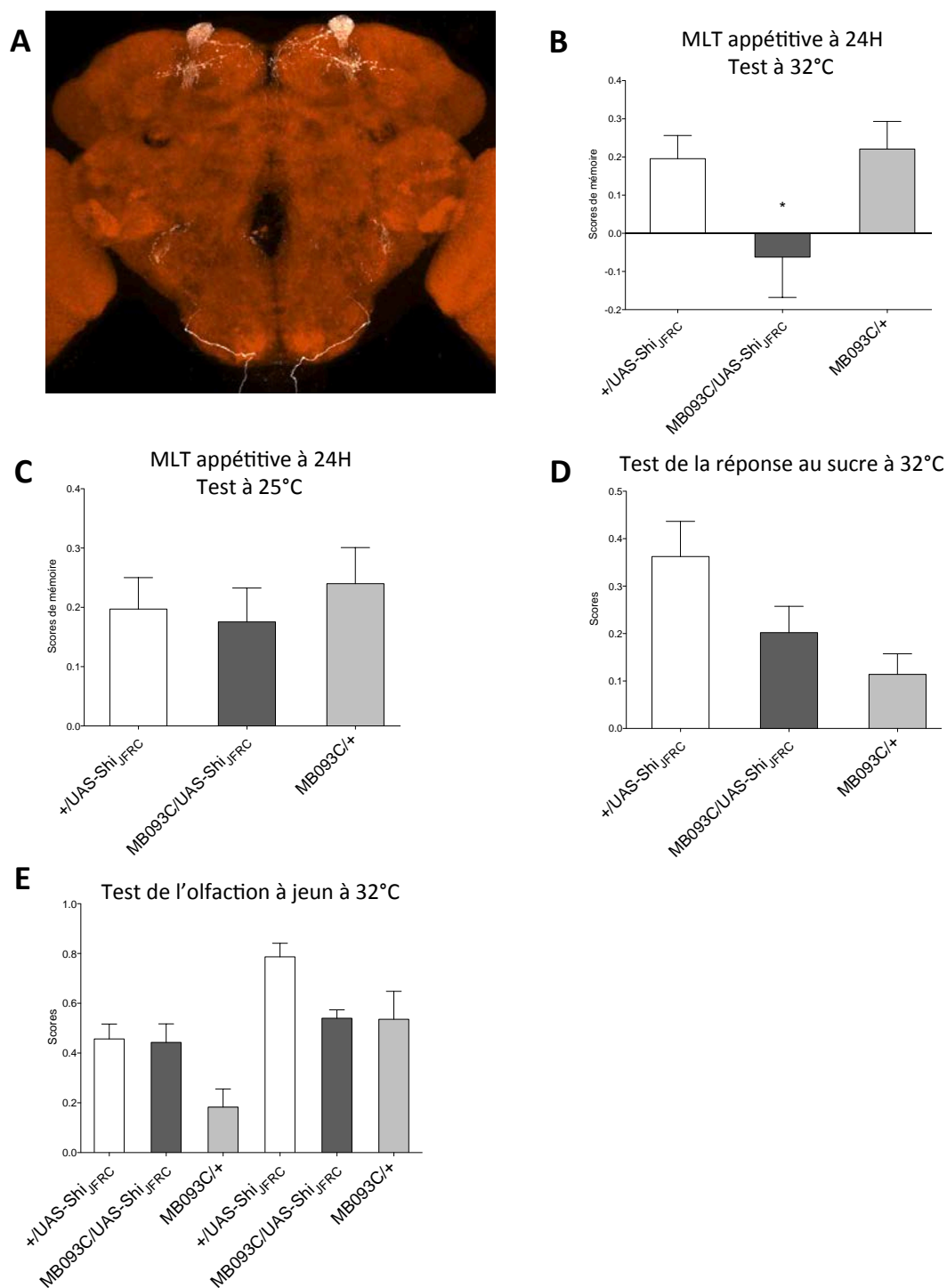


Figure 80 : Les neurones MB-V3 sont requis pour le rappel de la MLT appétitive

La lignée MB093C marquant les neurones MB-V3 (A) présente un défaut de MLT appétitive quand le test est fait à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0396$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=11-13$) (B), mais aucun défaut ni à température permissive ($p_{ANOVA}=0,7142$, $n=7-9$) (C), ni pour la réponse au sucre à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0197$, $n=8-10$) (D), ni pour l'olfaction à jeun à température restrictive (Pour O, $p_{ANOVA}=0,0134$, $n=8-14$; pour M, $p_{ANOVA}=0,0610$, $n=6-7$) (E).

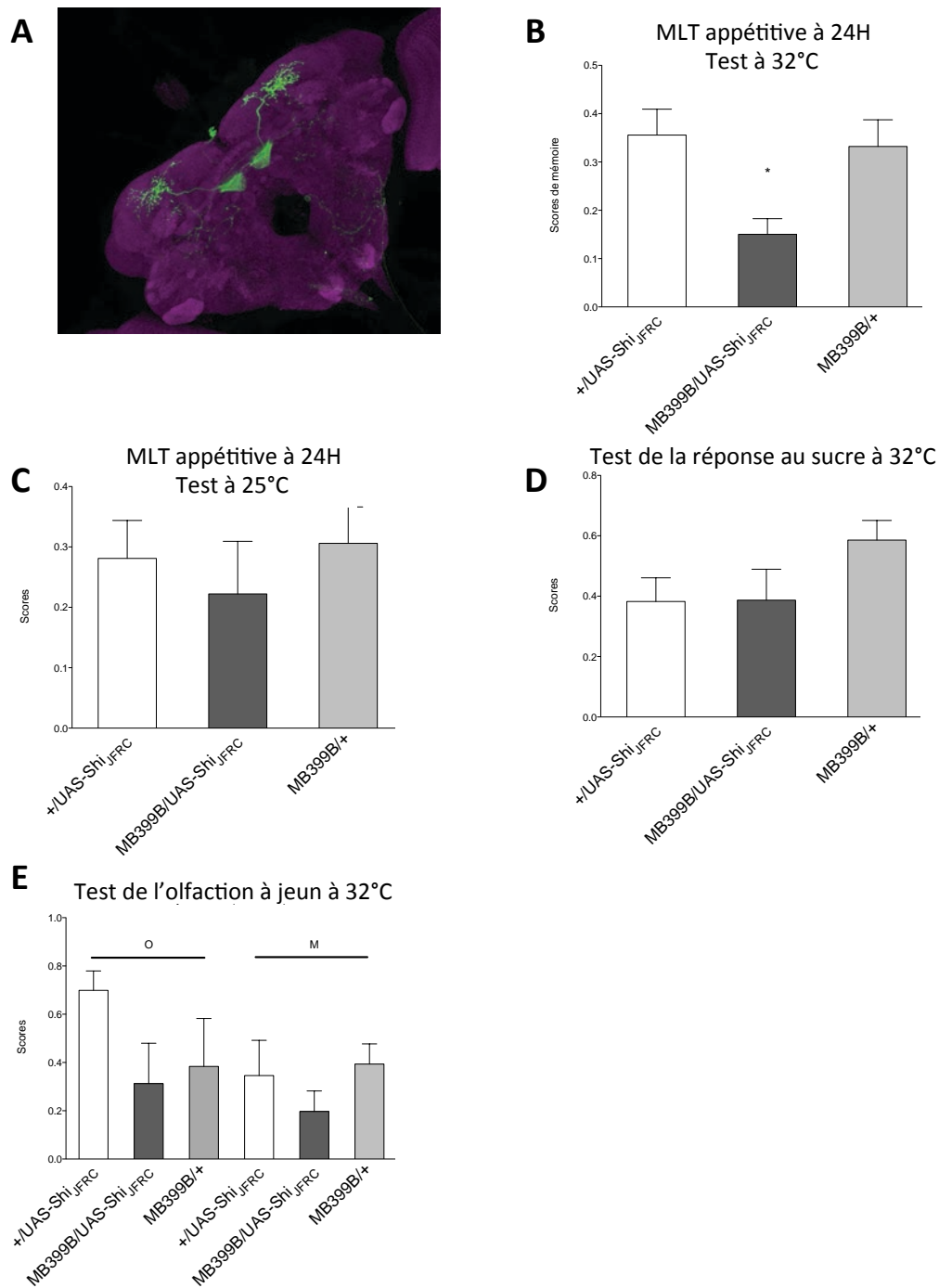


Figure 81 : Les neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$ sont requis pour le rappel de la MLT appétitive

La lignée MB399B marquant les neurones Output $\beta 2\beta'2a$ (A) présente un défaut de MLT appétitive quand le test est à température restrictive ($p_{POST-HOC} < 0,05$, $n=13-17$) (B), mais aucun défaut ni à température permissive ($p_{ANOVA} = 0,6962$, $n=9$) (C), ni pour la réponse au sucre à température restrictive ($p_{ANOVA} = 0,1393$, $n=6-8$) (D), ni pour l'olfaction à jeun à température restrictive (Pour O, $p_{ANOVA} = 0,2044$, $n=8$; pour M, $p_{ANOVA} = 0,4364$, $n=9-10$) (E).*

Parmi les nombreuses lignées ayant échoué lors du re-test, nous avons en premier lieu le cas où aucun défaut à température restrictive n'a pu être observé (de façon contradictoire

aux suggestions du criblage initial) pour les lignées MB371B (KC α/β *postérieur*), MB310C (neurones *Output* α 1) MB434B (neurones *Output* β 1), MB022B (neurones afférents octopaminergiques), MB087C (neurones afférents dopaminergiques PAM β '2a) (Figure 82 A à E).

Ensuite, d'autres lignées ont présenté un défaut rédhibitoire en test à température permissive : il s'agit des lignées MB419B et 607B (lignée supplémentaire ne faisant pas partie de la banque initiale) pour les KC γ *dorsal*, de la lignée MB477B pour les KC α/β *surface* et α/β *cœur externe*, et la lignée MB074C pour le cluster M4-M6-*Output* β 2 β '2a (respectivement neurones *Output* β '2mp, neurones *Output* γ 5 β '2a, neurones *Output* β 2 β '2a)(Figure 82 F à I).

De plus, d'autres lignées ont elles été éliminées en raison de défaut de réponse au sucre à température restrictive. On trouve parmi elles la lignée MB418B marquant les KC α'/β' *median*, MB052B marquant intégralement le cluster MB-V2, la lignée MB082C marquant les MB-V3 et MB-V4, ainsi que la lignée MB112C marquant les neurones MVP2 (Figure 82 J à M).

En outre, deux lignées ont pu être exclues en raison cette fois d'un défaut d'olfaction à température restrictive : MB370B marquant les 3 sous-types de KC α'/β' et la lignée MB542B marquant les MB-V2 α 2p et α '3p α '3m (Figure 82 N et O).

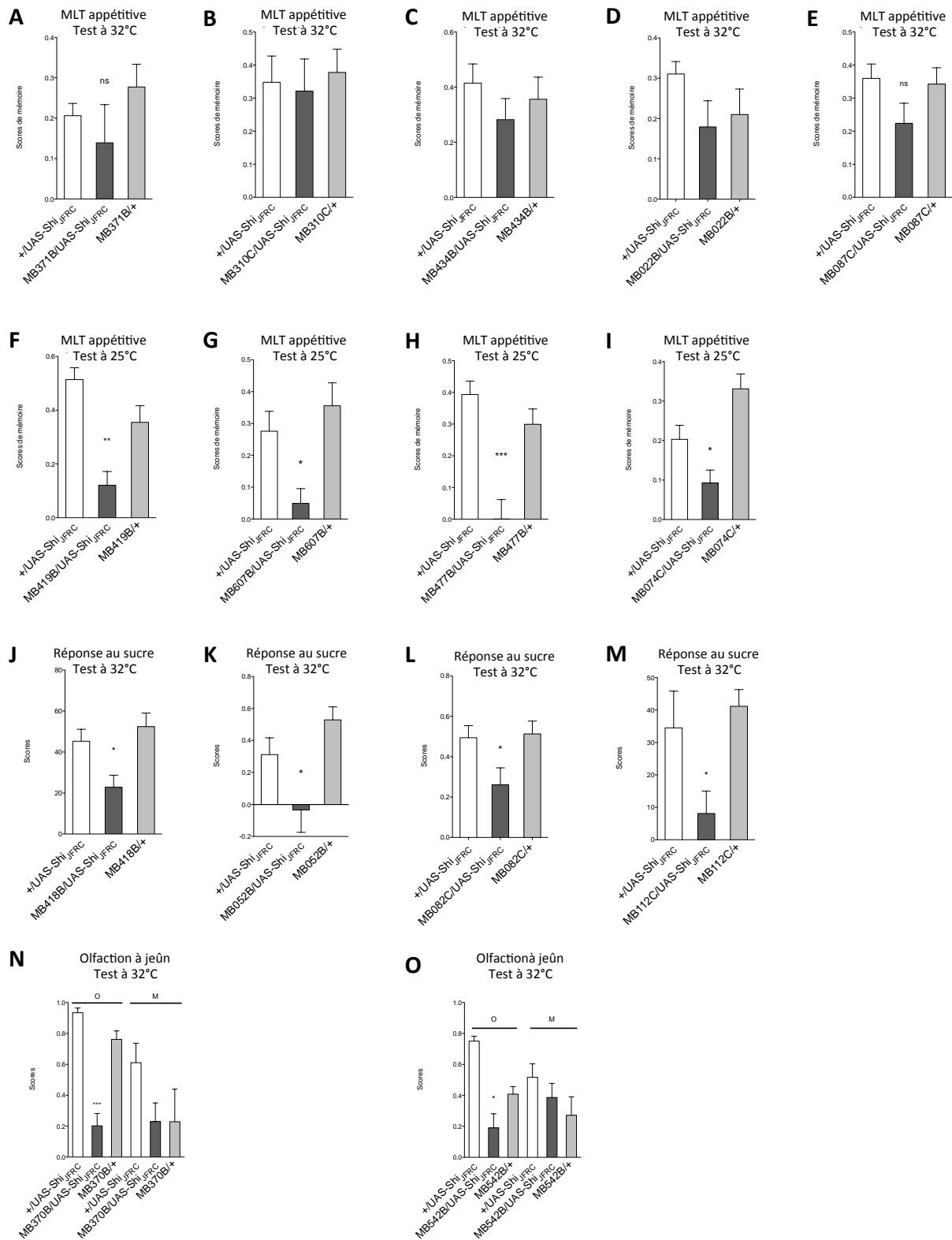


Figure 82 : Lignées n'ayant pas passé avec succès les contrôles de l'étape de confirmation

Les lignées MB371B (KC α/β postérieur), MB310C (neurones Output $\alpha 1$), MB434B (neurones Output $\beta 1$), MB022B (neurones octopaminergiques) MB087C

(neurones dopaminergiques PAM β '2a) ne présentent pas défaut significatif par rapport aux deux contrôles lors du re-test à température restrictive (respectivement : $p_{ANOVA}=0,3342$, $n=14-16$; $p_{ANOVA}=0,8860$, $n=9-10$; $p_{ANOVA}=0,5260$, $n=7-11$; $p_{ANOVA}=0,2083$, $n=10-11$; $p_{ANOVA}=0,1438$, $n=15-17$) (A à E). Les lignées MB419B et MB607B (KC γ dorsal), MB477B (KC α/β surface et α/β cœur externe), MB074C (MB-M6 ou neurones Output $\gamma 5\beta$ '2a, neurones Output $\beta 2\beta$ '2a, MB-M4 ou neurones Output β '2mp) présentent un défaut même lorsque le test est effectué à la température permissive de 25°C (respectivement : $p_{ANOVA}<0,0001$, $**p_{POST-HOC}<0,01$, $n=9-10$; $p_{ANOVA}=0,0035$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=12$; $p_{ANOVA}<0,0001$, $***p_{POST-HOC}<0,001$, $n=9-10$; $p_{ANOVA}=0,0001$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=16-18$) (F à I). Les lignées MB418B (KC α'/β' median), MB052B (cluster MB-V2), MB082C (MB-V3 et MB-V4) et MB112C (neurones MVP2) présentent un défaut de réponse au sucre à température restrictive, potentiellement responsable d'un défaut d'expression de la mémoire lors du rappel ($p_{ANOVA}=0,0046$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=12$; $p_{ANOVA}=0,0044$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=10-11$; $p_{ANOVA}=0,0330$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=8$ et $p_{ANOVA}=0,0181$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=12$ respectivement) (J à M). Les lignées MB370B (KC α'/β') et MB542B (neurones MB-V2 $\alpha 2p$, $\alpha' 3p$ et $\alpha' 3m$) présentent un défaut éliminatoire d'olfaction testée à jeun et à température restrictive (MB370B : pour O, $p_{ANOVA}<0,0001$, $***p_{POST-HOC}<0,001$, $n=10$; pour M, $p_{ANOVA}=0,1669$, $n=9-10$; MB542B : pour O, $p_{ANOVA}<0,0001$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=12$; pour M, $p_{ANOVA}=0,2388$, $n=12$) (N et O).

En conclusion, nous avons pu confirmer l'implication dans le rappel de la MLT appétitive des KC α/β , ainsi que des neurones MB-V3. Nous avons également pu confirmer un défaut pour la lignée MB399B, suggérant un rôle des neurones Output $\beta 2\beta$ '2a, bien que la lignée MB074C n'ait, elle, pas été confirmée.

Néanmoins, les nombreux défauts non spécifiques et quelques contradictions internes nous ont incité à ne pas inclure cette étude du rappel de la MLT appétitive dans l'article collaboratif final (se focalisant alors, pour la partie relative à notre participation, sur le rappel de la MLT aversive). Cela nous a en revanche laissé la liberté de pouvoir poursuivre nos investigations sur l'implication des neurones Output $\beta 2\beta$ '2a.

1.2. Etude de l'implication des neurones Output $\beta 2\beta$ '2a dans le rappel de la MLT appétitive

Les résultats obtenus avec la lignée MB399B suggèrent fortement un rôle des neurones Output $\beta 2\beta$ '2a, mais il est également absolument nécessaire de reproduire ces résultats avec au moins une lignée indépendante pour conclure de façon définitive.

Nous avons donc entrepris d'approfondir ce point à l'aide de lignées Gal4 non-Split. Les deux premières lignées testées furent les 12C11 (marquant les neurones MB-M4 et

Output $\beta 2\beta'2a$) et VT46095 (marquant les neurones MB-M6 et *Output* $\beta 2\beta'2a$). Comme le montre la Figure 83, ni l'une ni l'autre ne présente de défaut significatif en condition de test à température restrictive.

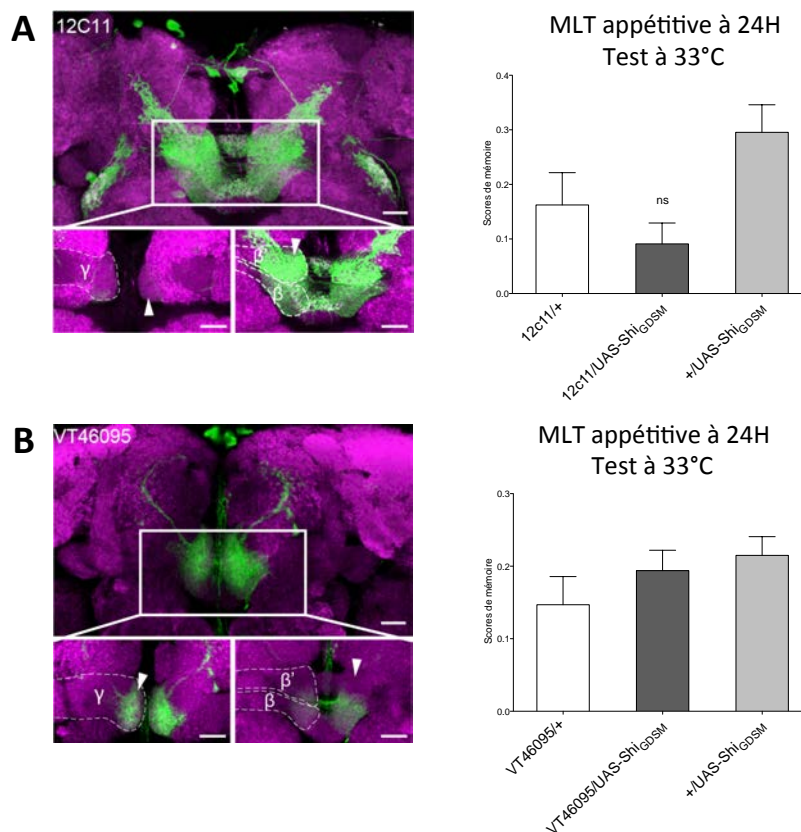


Figure 83 : Deux lignées pour les neurones $Output\beta 2\beta'2a$ ne présentent pas de défaut en test à température restrictive

(A) La lignée 12C11 marque les neurones MB-M4 (ou neurones *Output* $\beta'2mp$) et *Output* $\beta 2\beta'2a$, la magnification montrant des projections sur les lobes β et β' . Il n'y a pas de défaut significatif de MLT appétitive avec le blocage pendant le test ($p_{ANOVA}=0,0210$, $n=15-16$).

(B) La lignée VT46095 marque les neurones MB-M6 (ou neurones *Output* $\gamma 5\beta'2a$) ainsi que les neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$. Le score de mémoire du génotype d'intérêt n'est pas différent de celui des contrôles ($p_{ANOVA}=0,2955$, $n=19-20$).

Bien que ces résultats soient peu encourageants, nous avons considéré la possibilité que ces résultats négatifs soient la conséquence d'une expression trop faiblement induite dans les neurones d'intérêt via ces lignées. Dans ce cas, l'identification d'une autre lignée présentant un défaut pourrait toujours nous permettre de conclure à l'implication des neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$.

Nous avons alors reconsidéré l'utilisation de la lignée MB074C : en effet celle-ci avait été éliminée lors de l'étape de confirmation du criblage Split-Gal4 en raison d'un défaut à température permissive. Ce défaut était potentiellement lié à l'utilisation du transgène UAS-Shi_{JFRC}, dédié à une expression plus importante que la version classique (Kitamoto, 2001), considéré le nombre assez important de défauts non-spécifiques que nous avons eu avec cet effecteur. On peut d'ailleurs remarquer à ce propos que notre collaborateur Hiromu Tanimoto a pour son étude de la MMT olfactive changé son effecteur UAS-Shi_{JFRC} pour l'UAS-Shi_{GDSM}, et ce en raison des mêmes défauts non spécifiques. En conséquence, nous avons réitéré l'expérience en pilotant cette fois l'expression de la version classique UAS-Shi_{GDSM}.

Dans ces conditions, on retrouve le défaut en conditions de blocage synaptique pendant le rappel mnésique (Figure 84). De plus, il semble qu'aucun défaut ne soit observable à température permissive, nous incitant à conclure à l'implication définitive des neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$ dans le rappel de la MLT appétitive.

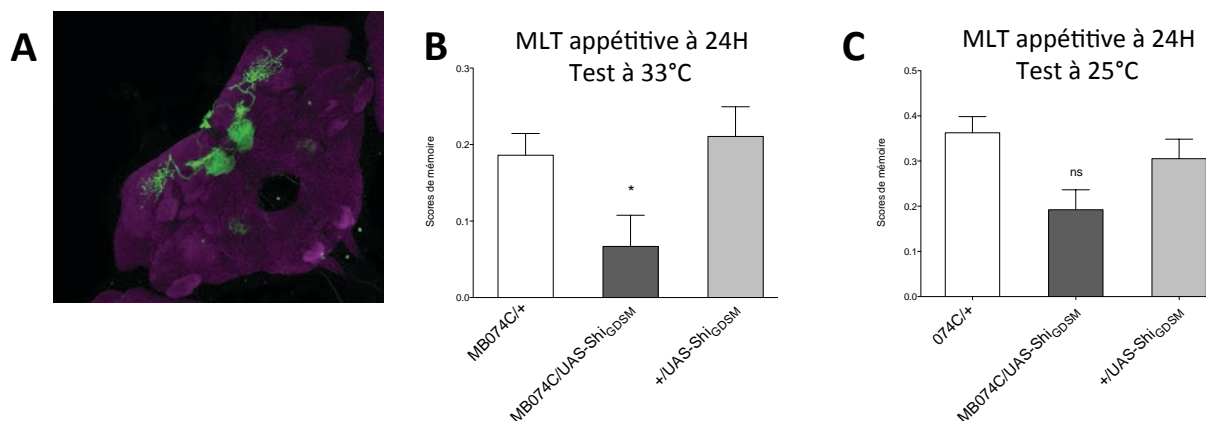


Figure 84 : La lignée MB074C semble présenter un défaut spécifique de MLT appétitive

*La lignée MB074C marque les neurones MB-M4, MB-M6 et Output $\beta 2\beta'2a$, comme le révèle ici l'expression de la GFP via ce pilote (A). Le génotype MB074C/ UAS-Shi_{GDSM} présente un défaut significatif par rapport aux contrôles lors du test à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0152$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=24-25$) (B). En cas de test à température permissive, MB074C/ UAS-Shi_{GDSM} ne présente pas de défaut significatif par rapport aux contrôles ($p_{ANOVA}=0,0161$, $n=22-24$) (C).*

Afin de savoir si le défaut imputé au blocage des neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$ est spécifique du rappel de la MLT, nous avons entrepris de tester si le blocage de ces neurones pendant le rappel de la MMT appétitive induit également un défaut. Nous avons pour cela

utilisé les deux lignées ayant présenté un défaut avéré de rappel de MMT appétitive, MB399B (utilisée avec UAS-Shi_{JFRC}) et MB074C (utilisée avec UAS-Shi_{GDSM}).

Au final, nous avons pu observer que la lignée MB399B présente un défaut à température restrictive, mais aucun défaut à température permissive (Figure 85 A et B). En revanche, la lignée MB074C ne présente pas de défaut en test à température restrictive, ce qui constitue une contradiction inexplicée avec le résultat de MB399B (Figure 85 C).

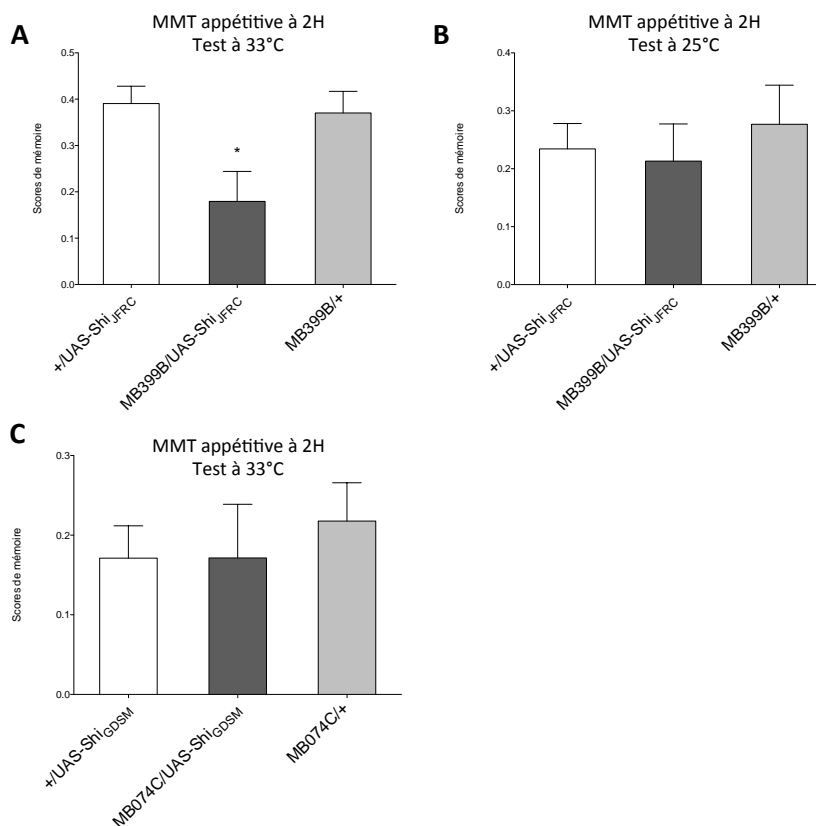


Figure 85 : L'implication des neurones Output $\beta 2\beta'2a$ pour le rappel de la MMT appétitive n'est pas certaine

*La lignée MB399B utilisée avec l'effecteur UAS-Shi_{JFRC} présente un défaut de MMT en condition de test à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0082$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=15-20$) (A), mais pas de défaut en condition de test à température permissive ($p_{ANOVA}=0,7447$, $n=11-12$) (B).*

En parallèle, nous avons entrepris d'étudier la réponse physiologique de ces neurones lors d'une présentation d'odeur, et de voir si une éventuelle réponse serait alors affectée par le conditionnement. Cependant, malgré mes tentatives, je n'ai jamais pu observer de réponse aux odeurs employées pour le conditionnement, tant chez des drosophiles naïves que chez des drosophiles conditionnées.

Les contradictions observées entre les différentes lignées pilotes en MLT appétitive et en MMT appétitive ont altéré la foi que nous avions dans le résultat initialement prometteur de MB399B. Ceci, ajouté au fait que nous n'avons pas pu observer d'activité calcique liée au rappel mnésique en imagerie calcique, nous a incité à ne malheureusement pas pousser plus loin nos investigations sur le rôle des neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$ dans le rappel de la mémoire appétitive.

I.3. Etude de l'implication des neurones DPM et APL dans le rappel des Mémoires à Long Terme aversive et appétitive

Le but affiché de la collaboration initiée par JFRC était de tester le rôle des KC et des neurones efférents et afférents aux KC de façon systématique. Cependant, deux types neuronaux n'ont pu être ciblés dans la banque de lignée SplitGal4 : il s'agit des neurones APL (*Anterior Paired Lateral*) et DPM (*Dorsal Paired Medial*), par ailleurs déjà décrits (cf introduction).

Nous nous y sommes donc intéressés, en complément de l'étude menée en collaboration avec Gerald Rubin.

I.3.1 Les neurones DPM sont requis pour le rappel de la MLT aversive

I.3.1.1 Approche

Les neurones DPM avaient en réalité déjà été étudiés dans notre laboratoire, par un ancien étudiant en thèse, Julien Séjourné. Il les avait identifiés comme étant justement requis dans le rappel de la MLT aversive. A l'époque, deux pilotes d'expression Gal4, c316 et NP677 avaient été utilisés, mais n'étaient pas particulièrement spécifiques (éléments présentés dans le manuscrit de thèse de Julien Séjourné). Pour valider et renforcer ce résultat, bien qu'aucune lignée Split-Gal4 n'existe pour les neurones DPM, nous avons pu mettre à profit une lignée Gal4 non-Split très spécifique parue depuis, la lignée VT64246 (Lee et al., 2011).

I.3.1.2 Confirmation comportementale de l'implication des neurones DPM dans le rappel de la MLT aversive

Notons que pour des raisons de cohérence avec les conditions d'expérimentation de l'époque, j'ai utilisé une température permissive de 20°C (y compris pour le conditionnement) et une température restrictive de 31°C.

Nous avons ainsi observé un déficit mnésique en condition de blocage effectif des neurones DPM pendant le rappel mnésique (Figure 86 B), mais une absence de défaut en condition permissive (Figure 86 C), ainsi qu'une absence de défaut d'olfaction à température restrictive (Figure 86 D). De plus, nous avons pu confirmer, comme avec les lignées c316 et NP677, que les DPM ne sont en revanche pas impliqués dans le rappel de la MRA à 24H (ou LT-ARM) (Figure 86 D).

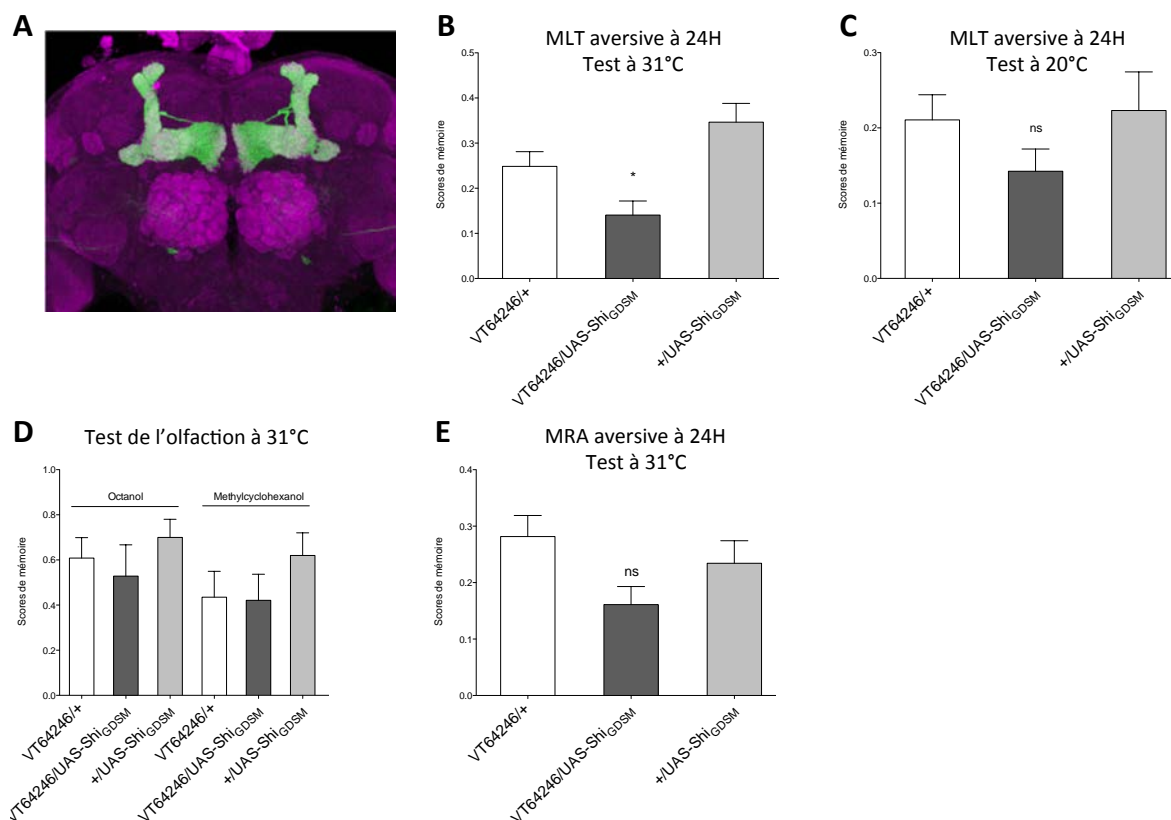


Figure 86 : Les neurones DPM sont requis spécifiquement dans le rappel de la MLT aversive

*Le patron d'expression de la lignée VT64246, révélé par la GFP (A), montre une grande spécificité pour les neurones DPM (Lee et al., 2011). Le blocage des neurones DPM chez VT64246/UAS-Shi^{GDSM} produit un défaut de mémoire significatif ($p_{ANOVA}=0,0072$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=14-16$) (B), tandis qu'aucun défaut n'a pu être observé pour le contrôle à température permissive*

($p_{ANOVA}=0,3038$, $n=16$) (C) et ni pour le contrôle de l'olfaction à température restrictive (Pour O, $p_{ANOVA}=0,5350$, $n=6$; pour M, $p_{ANOVA}=0,3813$, $n=8$) (D. De plus, le blocage des neurones DPM pendant le rappel de la MRA à 24H n'induit pas non plus de défaut ($p_{ANOVA}=0,0727$, $n=19$) (E).

1.3.1.3 Recherche de trace mnésique par imagerie calcique

Après avoir confirmé le rôle des neurones DPM pour le rappel de la MLT aversive, nous avons décidé d'étudier comment ceux-ci répondent aux odeurs et s'ils sont le siège d'une trace mnésique afin de comprendre quel rôle ils jouent.

Classiquement, la réponse physiologique des neurones aux odeurs s'étudie en imagerie calcique, une technique que nous maîtrisons au laboratoire. Nous pouvons ainsi observer, sur des drosophiles ayant été préalablement conditionnées (en 5 cycles espacés, dans notre cas) l'effet que produit la perception des odeurs sur l'activité calcique des neurones ciblés. Dans ces conditions, on reproduit une situation de rappel de MLT aversive, quand l'acquisition est réalisée 24 heures après le conditionnement.

J'ai procédé à l'enregistrement des neurones DPM (au niveau de leurs projections sur les lobes verticaux) chez des drosophiles conditionnées en 5 cycles espacés avec le 3-Octanol (O) en SC+, ou avec le 4-Méthyl-cyclohexanol (M) en SC+. En contrôle de cette expérience, des mesures identiques ont été effectuées chez des drosophiles préalablement conditionnées avec un protocole « backward » espacé (procédure où les drosophiles reçoivent les chocs électriques puis, de façon non appariée, perçoivent les deux odeurs). Ce protocole contrôle non associatif n'aboutit pas à la formation de mémoire, bien que les individus sentent les mêmes odeurs et reçoivent le même nombre de chocs que les drosophiles du groupe d'intérêt.

Tout d'abord, nous avons pu reproduire l'observation (Yu et al., 2006) que les neurones DPM répondent aux odeurs utilisées classiquement pour le conditionnement, le 3-octanol (O) et le 4-méthylcyclohexanol (M) (Figure 87). Ensuite, nous avons recherché si les réponses varient selon le conditionnement utilisé. Nous avons observé une tendance à la baisse de la réponse à l'odeur SC+ par rapport à l'odeur SC-, ce qu'indique la variation de l'indice $\log \frac{\text{Amplitude de réponse à O}}{\text{Amplitude de réponse à M}}$ dans des directions opposées selon l'odeur ayant servi de SC+. Cependant, malgré un nombre de drosophiles testées relativement important ($n>10$), cette tendance n'a pas tendu à devenir significative.

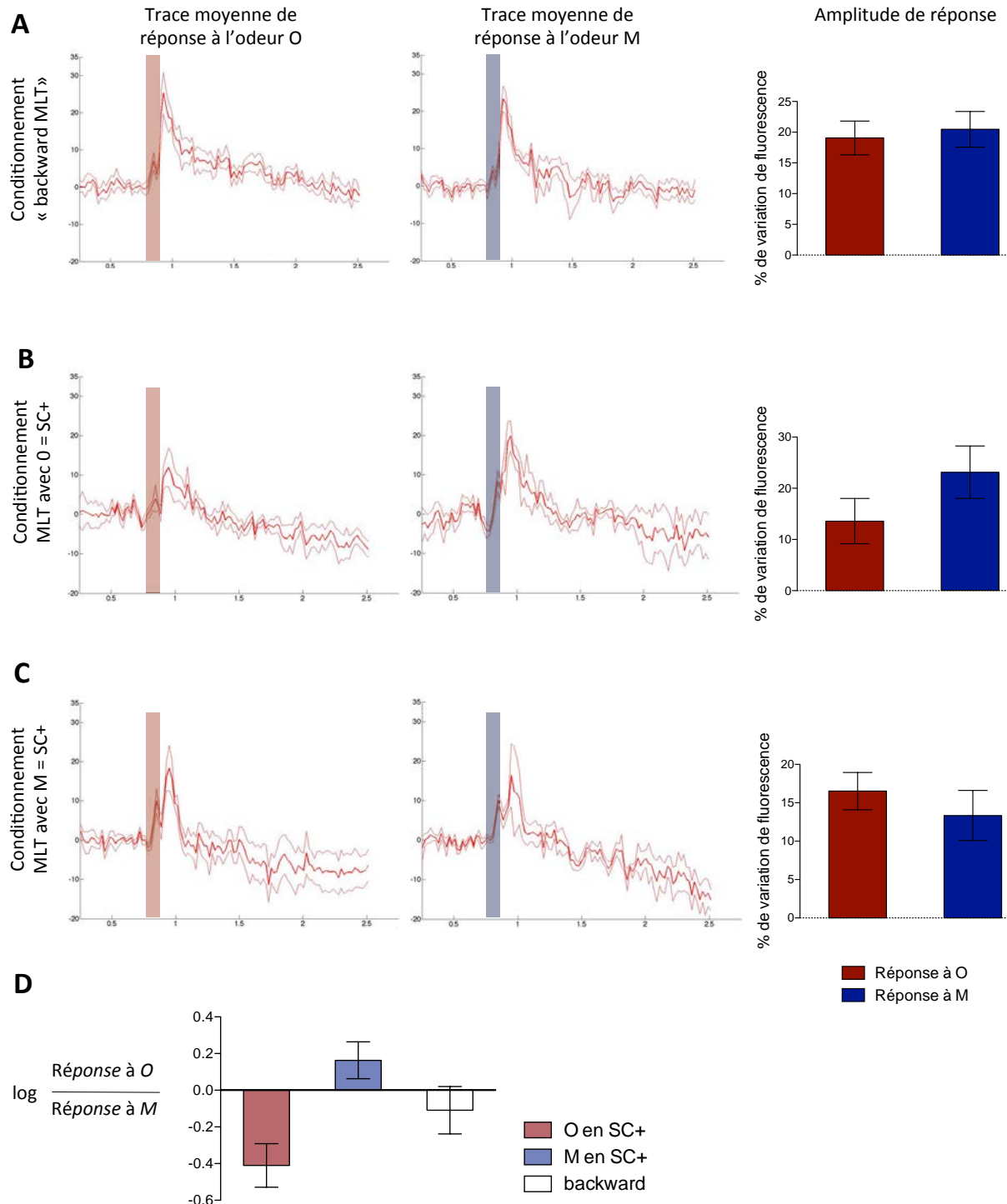


Figure 87 : Étude de la physiologie des neurones DPM en imagerie calcique

Pour chaque individu, on mesure l'amplitude des réponses aux odeurs O et M (Pour le décours temporel, 1 unité = 10s). L'amplitude est mesurée en pourcentage de variation de la fluorescence liée à GCaMP3 (A à C).

Ensuite, on calcule l'indice $\log \frac{\text{Amplitude de réponse à O}}{\text{Amplitude de réponse à M}}$ (D). Chez les drosophiles ayant subi un protocole « backward » espacé (i.e. non conditionnées) les réponses aux odeurs O et M, à 24h, semblent équivalentes avec un indice \log

$\frac{\text{Réponse à } O}{\text{Réponse à } M}$ non différent de zéro ($n=10$ individus enregistrés) (A et D). Chez les drosophiles conditionnées de façon espacée sur l'odeur O, on observe une tendance non significative à ce que la réponse à O (SC+) devienne inférieure à la réponse à M, à 24h, donnant un indice $\log \frac{\text{Réponse à } O}{\text{Réponse à } M}$ négatif (en t-test par rapport à la condition backward, la p-value est de 0,1034 ; $n=13$ individus enregistrés)(B et D). Chez les drosophiles conditionnées de façon espacée sur l'odeur M, on observe une tendance, non significative, à ce que la réponse à l'odeur M (SC+) devienne inférieure à la réponse à O, donnant un indice $\log \frac{\text{Réponse à } O}{\text{Réponse à } M}$ positif (en t-test par rapport à la condition backward, la p-value est de 0,1088 ; $n=11$ individus enregistrés) (C et D).

Ainsi, alors que les neurones DPM sont requis lors du rappel de la MLT aversive, nous n'avons pas pu conclure de façon définitive à l'existence d'une trace mnésique.

Notons qu'il avait déjà été montré que la neurotransmission des neurones DPM n'est pas requise pour le rappel de la MLT appétitive (Krashes and Waddell, 2008).

1.3.2 Implication des neurones APL pour le rappel de la MLT appétitive

Dans le même temps, nous nous sommes intéressés aux neurones APL, également non-présents dans la liste des lignées Split-Gal4. Sans a priori, nous avons recherché si leur neurotransmission était requise lors du rappel des MLT aversive et appétitive. Pour étudier les neurones APL, nous avons mis à profit une lignée Gal4 de la banque VT, VT43924 (Figure 88 A) (Wu et al., 2011).

Comme le montre la Figure 88 B, nous n'avons observé aucun défaut mnésique en condition de blocage pendant le rappel de la MLT aversive, en utilisant l'effecteur UAS-Shi^{GDSM} classique. Avec ce même effecteur, nous n'avons pas non plus observé de défaut de MLT appétitive en induisant un blocage des neurones APL pendant le rappel (Figure 88 C).

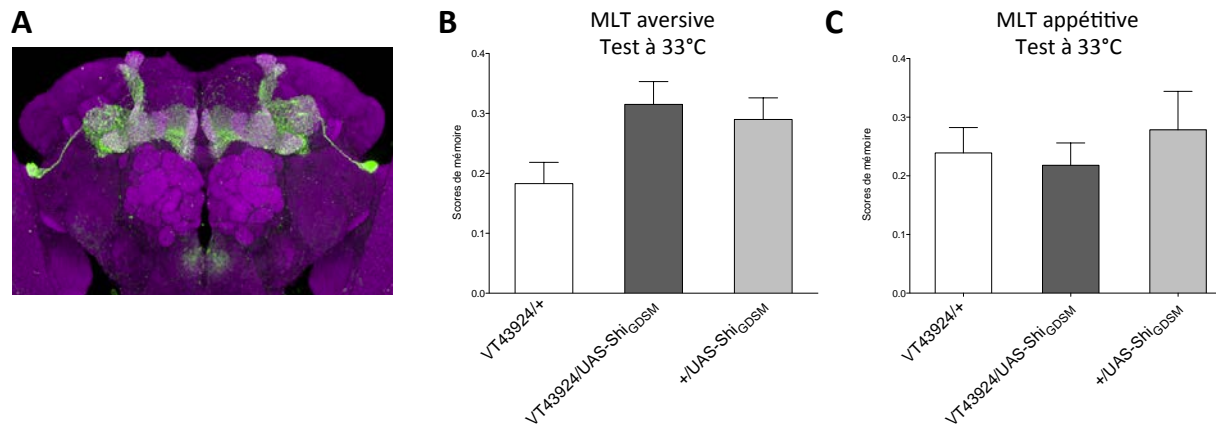


Figure 88 : Les neurones APL ne sont pas impliqués dans le rappel de la MLT aversive

La lignée VT43924 présente un patron d'expression spécifique des neurones APL, comme le révèle l'expression de la GFP par ce pilote (A). Nous n'avons observé, avec l'effecteur UAS-Shi^{GDSM} classique, aucun défaut de MLT aversive ($p_{ANOVA}=0,0321$, $n=16-17$) (B) ni de MLT appétitive aversive ($p_{ANOVA}=0,6844$, $n=10-11$) (C).

Ceci étant dit, le pilote d'expression VT43924 est relativement faible, ce qu'accrédite l'utilisation, dans l'article Wu et al., 2011, d'un amplificateur d'expression UAS-Gal4. Face à cela, nous avons réalisé la même expérience en utilisant cette fois l'outil UAS-Shi^{JFRC} qui permet une forte expression de Shi^{ts}.

Nous avons commencé par étudier dans ces nouvelles conditions la MLT appétitive. Les drosophiles VT43924/ UAS-Shi^{JFRC} présentent un défaut de MLT en condition de blocage pendant le rappel, laissant présager un rôle des APL à ce niveau (Figure 89 A). Malheureusement, le test à température permissive du même génotype montre un défaut nous empêchant finalement de conclure à l'implication des APL.

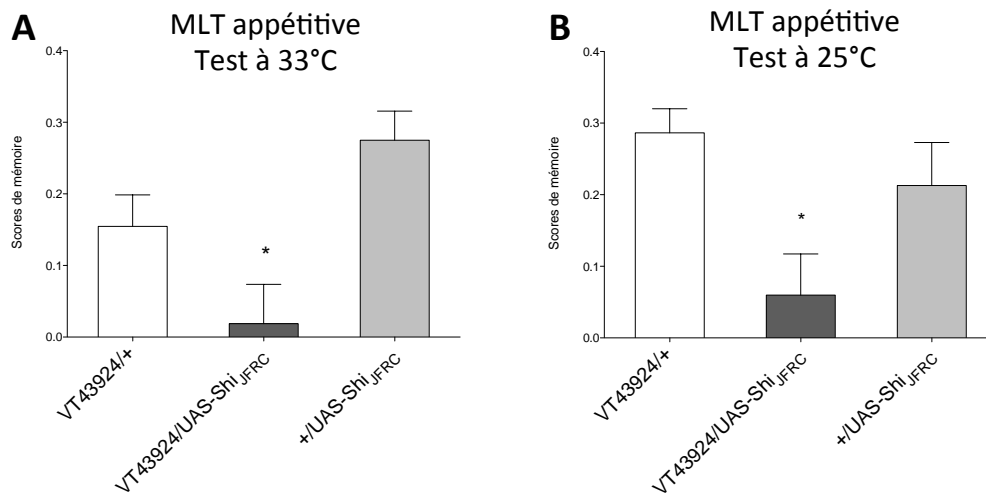


Figure 89 : Etude de l'implication des neurones APL dans le rappel de la MLT appétitive

*Le blocage des neurones APL via UAS-Shi_{JFRC} pendant le rappel de la MLT appétitive semble provoquer un défaut de mémoire ($p_{ANOVA}=0,0015$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=19-20$) (A). Mais le génotype d'intérêt présente également un défaut de mémoire à température permissive ($p_{ANOVA}=0,0110$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=16$) (B).*

Même si la MLT appétitive est affectée d'une quelconque manière par l'expression de UAS-Shi_{JFRC} dans les neurones APL, on ne peut conclure à un rôle spécifique de ces neurones pendant le rappel. En raison du défaut constitutif du génotype VT43924/UAS-Shi_{JFRC}, nous n'avons pas cherché à étudier la MLT aversive avec cet outil.

II. Etude des neurones en aval des MB-V2 nécessaires au rappel des mémoires aversives

II.1 Intérêt scientifique de la description du réseau neuronal en aval du centre de la mémoire

A l'heure actuelle, le champ disciplinaire de l'étude de la mémoire de la drosophile se rapproche de l'aboutissement en terme d'identification des KC et des neurones extrinsèques aux CP, requis pour les différentes étapes (apprentissage, consolidation, rappel) des différentes formes de mémoire.

Outre l'intérêt que constitue en soi l'identification de tous les neurones constituant la chaîne de transfert d'information des CP vers les centres moteurs permettant l'expression des comportements de fuite ou d'approche, plusieurs autres bénéfices peuvent être tirés de cette

approche. Notamment, une fois les neurones « n+1 » (neurones efférents aux CP), « n+2 » (neurones en aval des efférents), etc. identifiés, leur caractérisation fonctionnelle peut alors servir à l'approfondissement de l'étude des CP, l'activité (calcique par exemple) de ces neurones constituant une mesure de l'activité des CP.

Nous avons voulu appliquer cette démarche en nous appuyant sur les neurones efférents MB-V2, qui sont apparus être fondamentaux à l'issue de notre caractérisation exhaustive des neurones efférents requis pour le rappel de la MLT aversive. Comme notre équipe l'a montré récemment (Bouzaiane et al., 2015), les neurones MB-V2 efférents aux CP sont également impliqués dans le rappel des autres formes de mémoire encodées dans neurones α/β que sont la ST-ARM et de la MMT.

Les neurones MB-V2 sont vecteurs d'une information mnésique (Séjourné et al., 2011) et doivent la transmettre à des neurones de la CL et/ou du SIP, régions ciblées par leurs projections axonales (Figure 90).

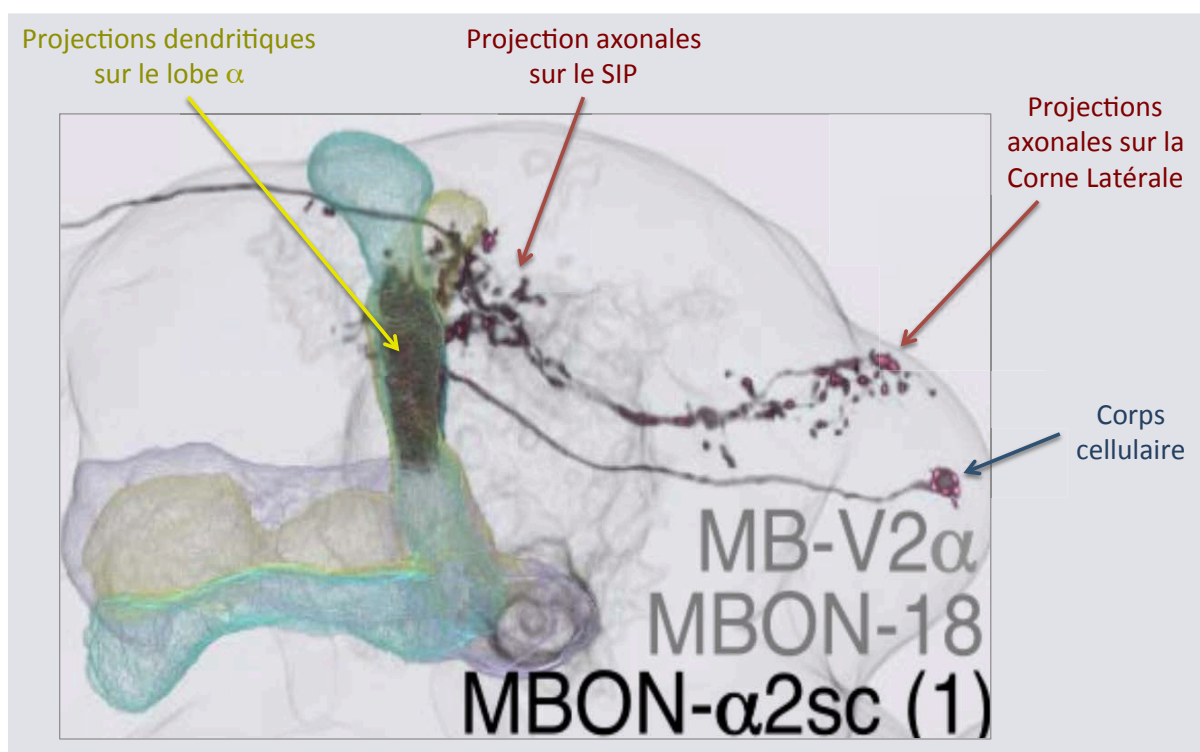


Figure 90 : Les neurones MB-V2 établissent un lien entre les Corps Pédonculés et la Corne Latérale

Les afférences des neurones MB-V2 (ici n'étant représentés que les MB-V2 α 2sc) se situent au niveau des lobe vertical des CP, et leurs efférences se partagent entre la CL, impliquée dans la réponse innée aux odeurs, et le SIP. Ces

neurones sont les seuls à établir le lien entre les CP et la CL (d'après Aso et al., 2014a).

La CL constitue un relai du traitement de l'information olfactive dans le cadre de la réponse innée aux odeurs aversives ou répulsives, et présente une représentation des odeurs stéréotypée. La question se pose donc de savoir si les MB-V2 contactent des neurones de la CL pour moduler la réponse innée aux odeurs ou si l'information mnésique chemine, au niveau de la CL, en parallèle de la voie innée.

Grâce à une rencontre fructueuse avec Gregory Jefferis (Cambridge University), nous avons eu connaissance de neurones de la CL et du SIP, potentiellement connectés et en aval des neurones MB-V2, et nous permettant de mener des investigations concernant cette problématique.

Bien que nous eussions préféré nous intéresser en premier lieu aux neurones en aval des MB-V2 dans le cadre de l'étude du rappel de la MLT, il nous est apparu plus approprié de commencer notre étude par des expériences de MMT pour des raisons pratiques, en gardant à l'esprit que la probabilité était réelle que le réseau de sortie soit le même pour les différentes formes de mémoire dépendant des MB-V2 et donc que ce qui serait découvert pour la MMT le serait également pour la MLT. Cependant, on ne pouvait pas exclure que selon l'intensité du signal transitant dans les MB-V2 il y ait un recrutement différentiel de neurones en aval.

Nous avons donc, dans le cadre d'une collaboration avec Gregory Jefferis, entrepris l'étude des neurones candidats. L'objectif suivant était, si l'on identifiait un type neuronal grâce à une étude comportementale, d'étudier ses propriétés physiologiques en imagerie calcique, pour voir sous quelle forme serait alors intégrée l'information issue des MB-V2.

II.2 Stratégie

Dans son travail initial, l'équipe de Gregory Jefferis a identifié cinq *clusters* de neurones de la CL potentiellement en aval des MB-V2, par des expériences anatomiques. Pour ce faire, Michael Dolan, un étudiant en thèse, a imagé des individus résultant du croisement entre la lignée 71D08-LexA/LexAop2-Brp::mCherry et chacune des lignées candidates Gal4 (pour les neurones aval des MB-V2)/UAS-GFP. Les terminaisons pré-synaptiques des MB-V2 sont alors marquées en rouge et les neurones candidats sont marqués en vert, donnant lieu à un criblage par recherche de co-marquage « mCherry/GFP » (Figure 91 A).

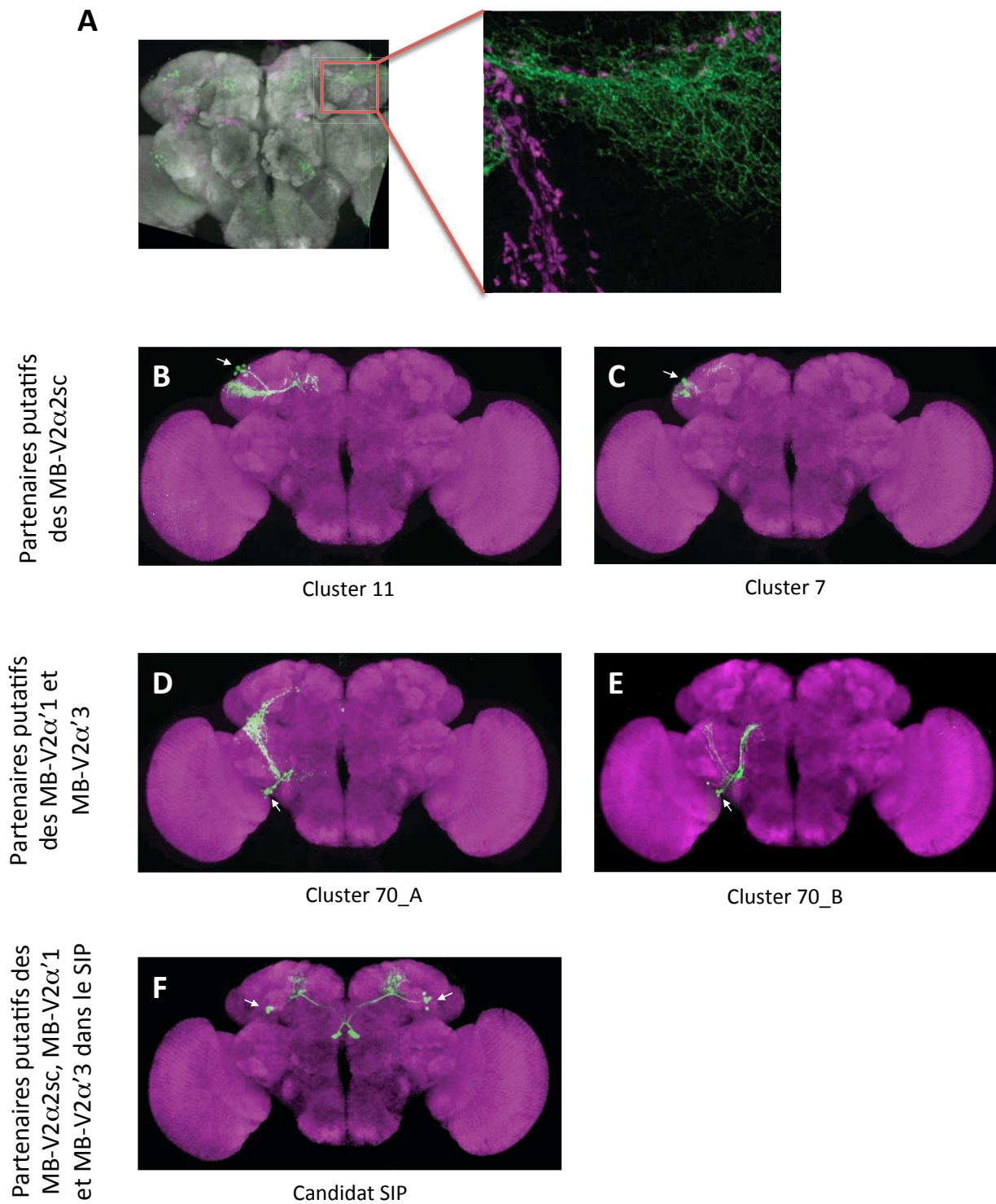


Figure 91 : Caractérisation anatomique des neurones partenaires putatifs des MB-V2 au sein de la Corne Latérale

La recherche de neurones potentiellement post-synaptiques aux MB-V2 s'est effectuée par criblage de co-marquages entre les MB-V2 (rouge) et les neurones testés (vert) (A).

Cela a permis de proposer plusieurs clusters de neurones candidats : les clusters 11(B) et 7(C) potentiellement connectés aux neurones MB-V2 α 2sc, les clusters 70_A (D) et 70_B (E) potentiellement connectés aux neurones MB-V2 α '3 et MB-V2 α '1 et un cluster qui établirait des connexions avec les neurones MB-V2 α 2sc, MB-V2 α '3 et MB-V2 α '1 au niveau du SIP (F). Les corps cellulaires des neurones sont indiqués par les flèches. Images fournies par l'équipe de Gregory Jefferis et présentant uniquement les neurones d'intérêt, et non pas le marquage total des lignées Gal4.

Au final, deux clusters seraient potentiellement en aval des neurones MB-V2 α 2sc, les Clusters 11 et 7, deux clusters seraient en aval des neurones MB-V2 α '3 et MB-V2 α '1, les Clusters 70(A) et 70(B), et un cluster serait en aval des projections des MB-V2 (α et α ') au niveau du SIP (pour *Superior Intermediate Protocerebrum*) (Figure 92). En parallèle, Michael Dolan a réalisé la caractérisation de la polarité et du type de neurotransmetteur utilisé pour les différents clusters candidats.

Cependant, étant donné que les formes de mémoire dont le rappel implique les neurones MB-V2 sont localisées dans les KC α/β (Bouzzaiane et al., 2015), nous avons jugé qu'il était moins vraisemblable que les neurones en aval des MB-V2 α ' soient nécessaires lors du rappel. Nous avons décidé de nous focaliser pour nos premières expériences sur les clusters (potentiellement) en aval des MB-V2 α , c'est à dire les Clusters 7 et 11, ainsi que le cluster projetant au niveau du SIP (Figure 92).

Mémoires étudiées	Efférences en jeu au niveau des KC	Neurones efférents aux CP impliqués	Neurones en aval candidats
MLT	KC α/β (lobes verticaux)	MB-V2 α (seulement?) Projections vers : - Corne Latérale - SIP	Cluster 11
MMT	KC α/β		Cluster 7
ST-ARM	KC α/β		Cluster candidat SIP
		MB-V2 α ' Projections vers : - SIP - Corne Latérale	Cluster 70(A)
			Cluster 70(B)

Figure 92 : Résumé des types neuronaux impliqués dans le projet

II.3 Les neurones du *Cluster 11* sont requis pour le rappel de différentes formes de mémoire aversive

J'ai commencé à étudier l'implication potentielle des neurones des différents *clusters* potentiellement en aval des neurones MB-V2 α 2sc en MTM, en gardant la perspective de tester également l'implication en MLT et en ST-ARM des neurones qui pourraient être identifiés.

II.3.1 Etude du rôle des différents clusters dans le rappel de la Mémoire à Moyen Terme

La lignée Insite0089 est l'unique lignée disponible à ce jour marquant le *Cluster 7*. Quand on bloque les neurones qu'elle marque avec UAS-Shi_{GDSM} lors du rappel de la MMT, on n'observe pas de défaut (Figure 93 B).

De même, nous n'avons qu'une seule lignée adressant le *Cluster* candidat du SIP, la lignée 58G03. Comme le montre la Figure 93 D, aucun défaut de MMT n'est observable en condition de blocage pendant le rappel.

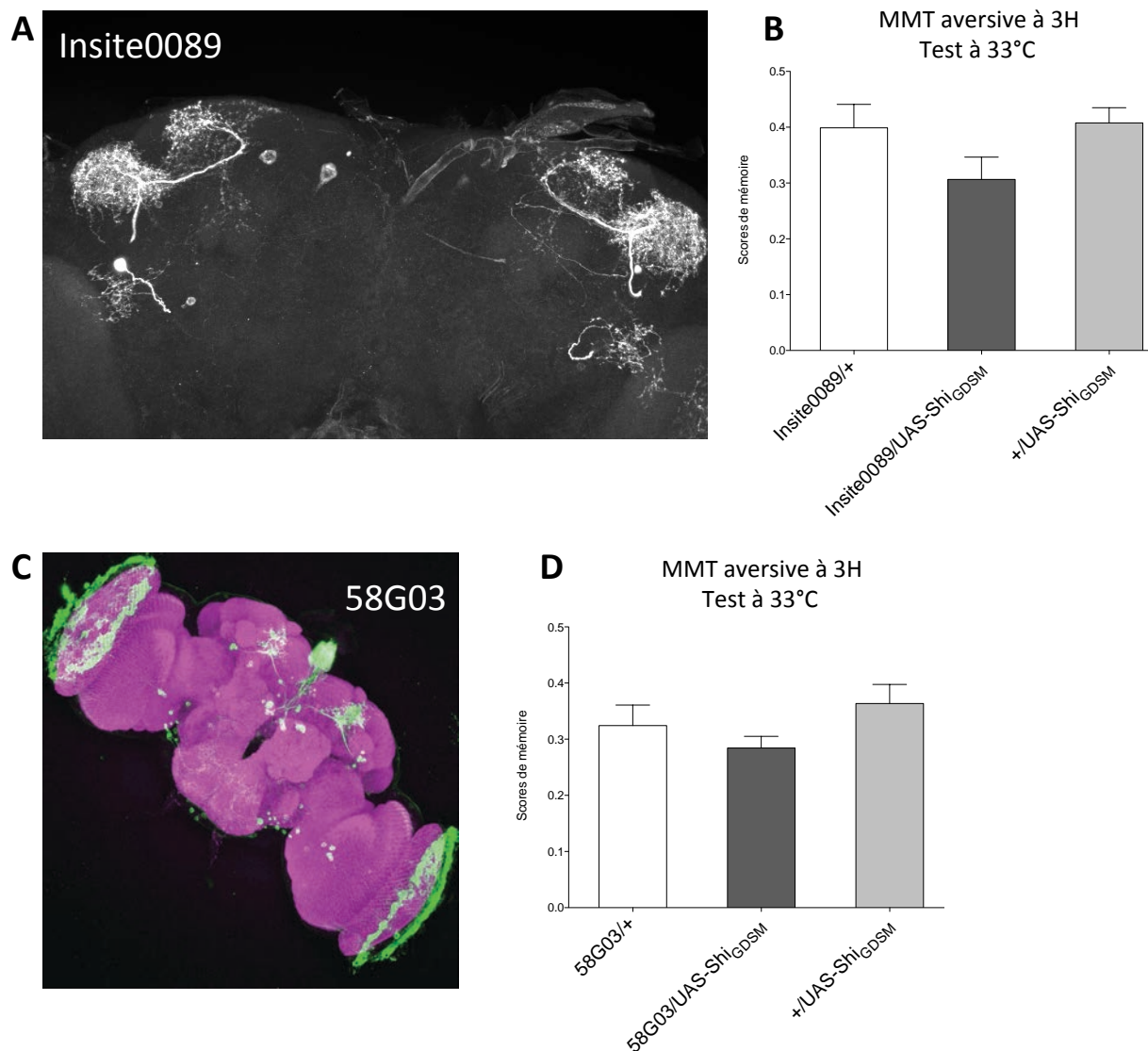


Figure 93 : Ni les neurones du Cluster 7 ni ceux du Cluster candidat du SIP ne sont nécessaires dans le rappel de la MMT aversive

La lignée Insite0089 induisant l'expression dans les neurones du cluster 7 ne donne pas lieu à un défaut avec UAS-Shi^{GDSM} lors d'un blocage pendant le rappel de la MMT aversive ($p_{ANOVA}=0,1123$, $n=17$) (B). Similairement, les neurones du Cluster candidat du SIP n'ont pu être impliqués avec la lignée 58G03 ($p_{ANOVA}=0,2121$, $n=14$) (D).

Concernant l'étude du Cluster 11, la première lignée testée, 37G11, a présenté un défaut de MMT (Figure 94 B). Nous avons donc réalisé les contrôles de l'olfaction à température restrictive et de la MMT à température permissive, et ils se sont révélés bons (Figure 94 C et D).

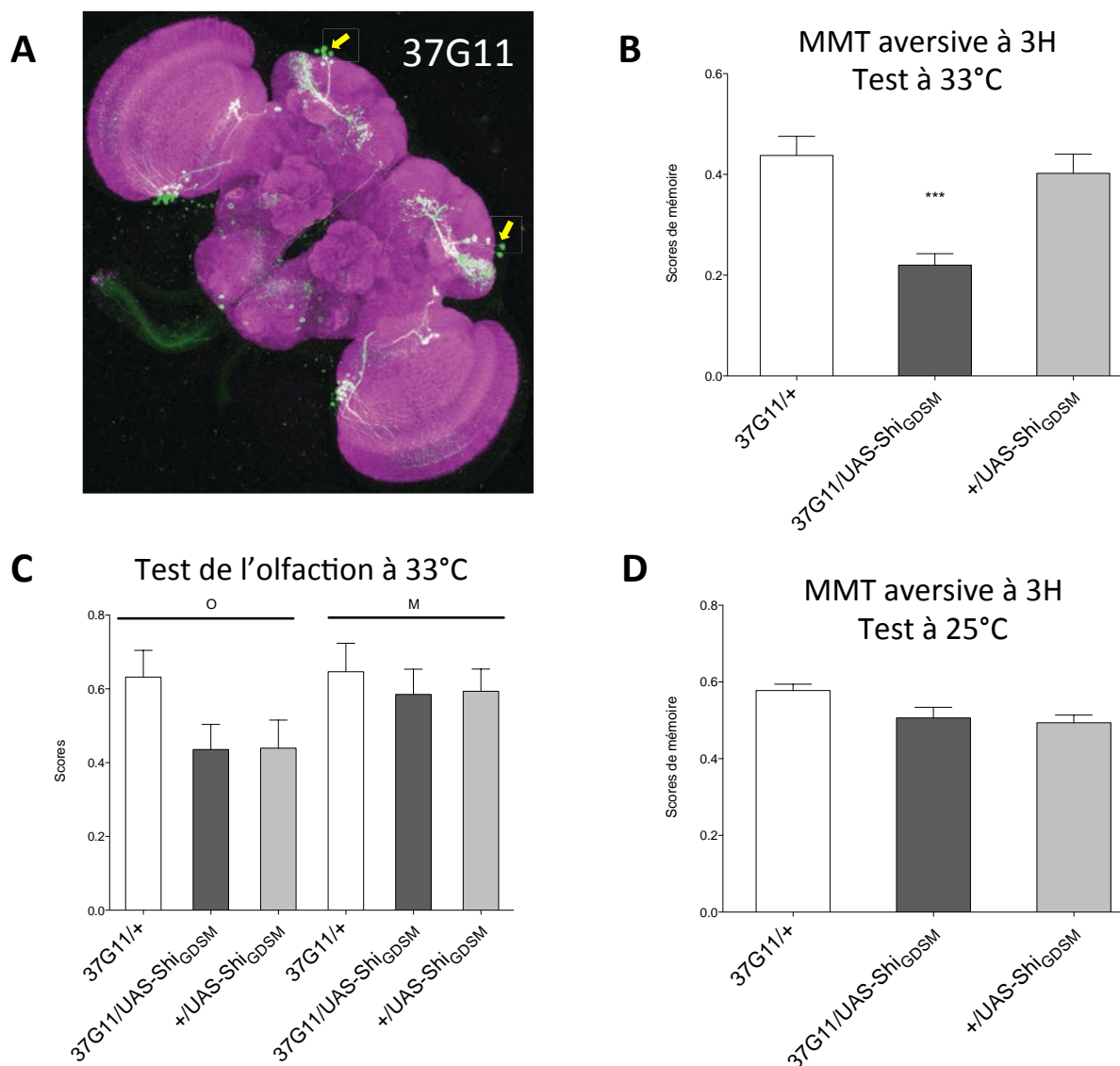


Figure 94 : La lignée 37G11 propose un rôle du *Cluster 11* dans le rappel de la MMT aversive

La lignée 37G11 pilote l'expression de transgènes d'intérêt dans les neurones du *Cluster 11* (corps cellulaires indiqués par les flèches jaunes) (A) et présente un défaut de MMT lorsque la neurotransmission est affectée lors du rappel ($p_{ANOVA}=0,0002$, $***p_{POST-HOC}<0,001$, $n=9$) (B). Le contrôle de l'olfaction à température restrictive est normal (Pour O, $p_{ANOVA}=0,1027$, $n=14$; pour M, $p_{ANOVA}=0,7937$, $n=14$) (C) et le contrôle de MMT à température permissive également ($p_{ANOVA}=0,0207$, $n=16$) (D), évacuant la possibilité de défaut non-spécifiques au blocage pendant le rappel.

Nous avons donc voulu confirmer ce résultat avec l'une des autres lignées marquant également le *Cluster 11*. Malheureusement, ni 48F03 ni 12A11 n'ont présenté de défaut en MMT à température restrictive (Figure 95 B et D). Cela n'infirme pas le résultat de 37G11 et peut signifier que ces lignées n'induisent pas une expression suffisamment forte de UAS-

Shi_{GDSM}, ou qu'elles marquent, au sein du *Cluster 11*, moins de neurones que 37G11 ou des neurones différents. En ce sens, on peut remarquer que l'intensité du marquage par expression de la GFP est plus faible dans 48F03 et 12A11 que dans 37G11, et même que le nombre de corps cellulaires marqués dans 12A11 semble inférieur.

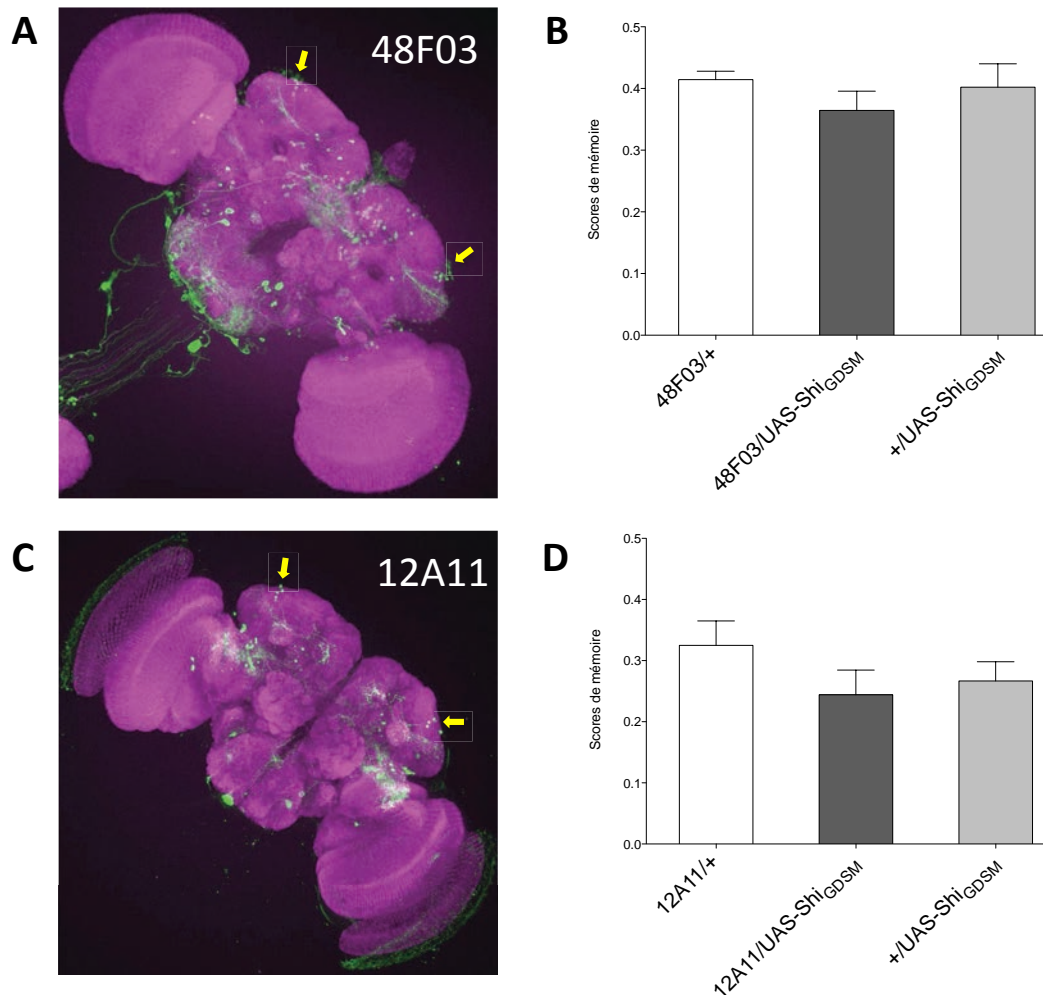


Figure 95 : Recherche d'autres lignées confirmant le phénotype de 37G11

Deux autres lignées marquant le *Cluster 11*, 48F03 et 12A11 ne présentent aucun défaut (respectivement : $p_{ANOVA}=0,4683$, $n=9$ et $p_{ANOVA}=0,3025$, $n=12$) (B et D). En B, le contrôle $+/ UAS-Shi_{GDSM}$ est commun à celui de la Figure 94 B, les lignées 37G11 et 48F03 ayant été testées ensemble.

En conclusion, le résultat encourageant obtenu avec la lignée 37G11 doit donc être reproduit avec une autre lignée Gal4 afin de confirmer l'implication du *Cluster 11*. Pour ce faire, l'équipe de Gregory Jefferis nous a procuré des lignées supplémentaires adressant le *Cluster 11*, 77H09 et 12A12, (Figure 96), qui sont en cours de test.

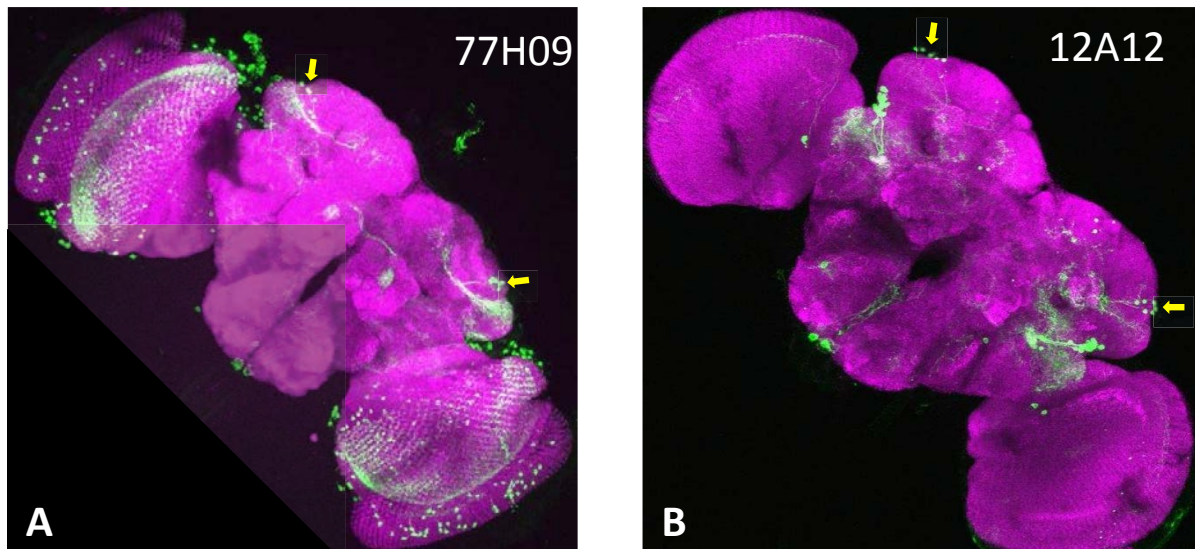


Figure 96 : Lignées supplémentaires marquant le *Cluster 11*

Les patrons d'expression des lignées 77H09 (A) et 12A12 (B) sont révélés par la GFP, les corps cellulaires des neurones du Cluster 11 étant indiqué par les flèches jaunes (images de la collection JFRC Flylight).

Puisque le *Cluster 11* semble requis pour le rappel de la MMT, et que les neurones MB-V2 α sont requis non seulement pour la MMT mais également pour la MLT et la ST-ARM, nous avons posé la question de l'implication du *Cluster 11* également dans le rappel de la MLT et de la ST-ARM. Nous avons donc décidé de tester si nous pouvions obtenir un défaut dans le cadre de ces paradigmes avec la lignée 37G11.

II. 3.2 Rôle dans le rappel de la MLT

Ainsi, nous testé l'impact du blocage des neurones de 37G11 lors du rappel de la MLT aversive : un défaut net est observable (Figure 97 A). De plus, ce défaut semble spécifique, puisqu'en conditions permissives, la MLT est normale (Figure 97 B).

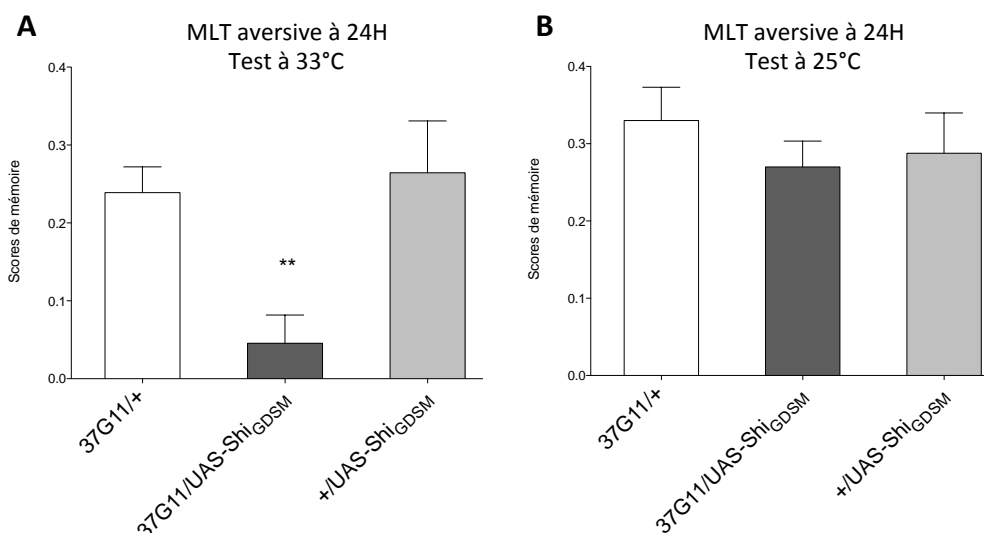


Figure 97 : Le *Cluster 11* serait impliqué également dans le rappel de la MLT aversive

*Les individus 37G11/UAS-Shi^{GDSM} présentent un défaut de MLT significatif à température restrictive ($p_{ANOVA}=0,0064$, $**p_{POST-HOC}<0,01$, $n=9$) (A). A température permissive, la MLT est sauvage pour ce même génotype ($p_{ANOVA}=0,5939$, $n=9-10$) (B).*

Nous allons également tenter de confirmer ce résultat avec une autre lignée Gal4.

II. 3.3 Rôle dans le rappel de la ST-ARM

Lorsque les drosophiles 37G11/UAS-Shi^{GDSM} sont soumises à une expérience de mémoire à $t=0$, avec blocage continu (il est en pratique impossible d'appliquer un blocage uniquement pendant le test pour une expérience de mémoire immédiate), on observe un défaut de mémoire par rapport aux contrôles génotypiques (Figure 98 A). Etant donné que les MB-V2 sont requis dans le rappel de la ST-ARM mais pas de la MCT (Bouzaiane et al., 2015), ce doit être spécifiquement la ST-ARM qui est affectée. En outre, lorsque l'expérience de mémoire immédiate est réalisée à température permissive (Figure 98 B), il n'y a pas de phénotype défectueux. Si l'on ne peut exclure à première vue que l'effet observé ici provienne du blocage pendant le conditionnement, il est néanmoins raisonnable de penser que l'effet observé est propre au rappel étant donné que les neurones du *Cluster 11* ne sont pas afférents aux CP.

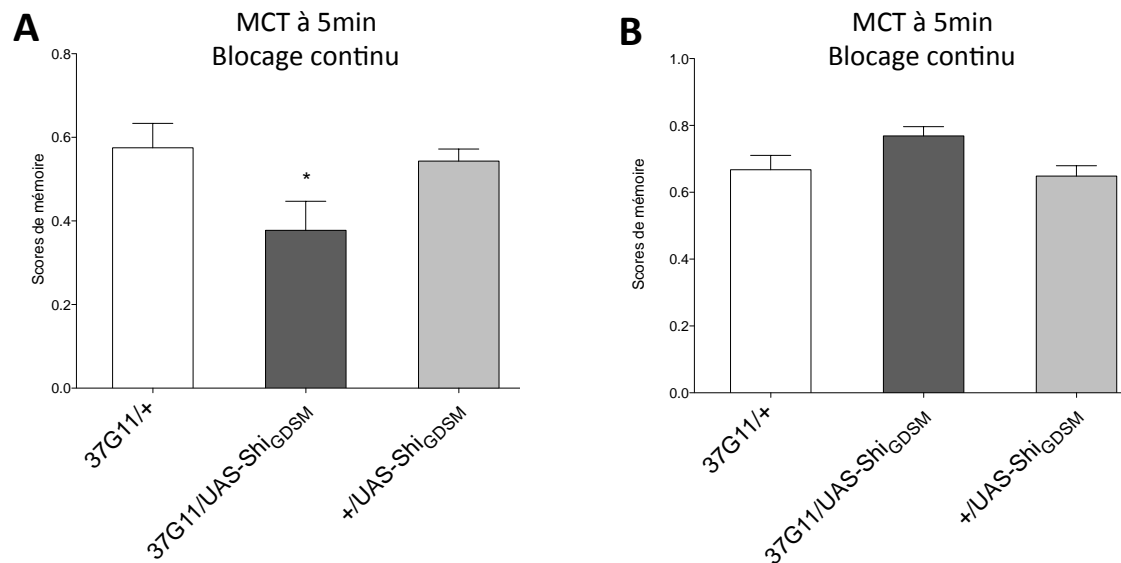


Figure 98 : Les neurones du *Cluster 11* seraient également impliqués dans le rappel de la ST-ARM

*La mémoire immédiate résistante à l'anesthésie (ou ST-ARM) est affectée par le blocage des neurones marqués dans 37G11 ($p_{ANOVA}=0,0328$, $*p_{POST-HOC}<0,05$, $n=12-13$) (A), tandis que le contrôle à température permissive ne montre aucun défaut non spécifique ($p_{ANOVA}=0,0481$, $n=8$) (B).*

Il nous faudra ici aussi confirmer ce résultat avec une autre lignée Gal4.

1.4 Recherche d'une modification de l'activité des neurones du *Cluster 11* dépendante de l'apprentissage

Ayant potentiellement identifié des neurones requis lors du rappel de plusieurs types de mémoire aversive, nous avons ensuite entrepris d'étudier leur physiologie en imagerie calcique. S'ils sont effectivement un maillon de la chaîne de conduction de l'information mnésique, ils pourraient présenter une réponse différente aux odeurs selon leur statut lors du conditionnement, reflet de la trace mnésique en amont.

Avant de rechercher de telles modifications d'activité, j'ai commencé par étudier les réponses aux odeurs chez des drosophiles naïves, c'est à dire vierges de tout conditionnement. L'état d'avancement de ce travail est présenté en Figure 99.

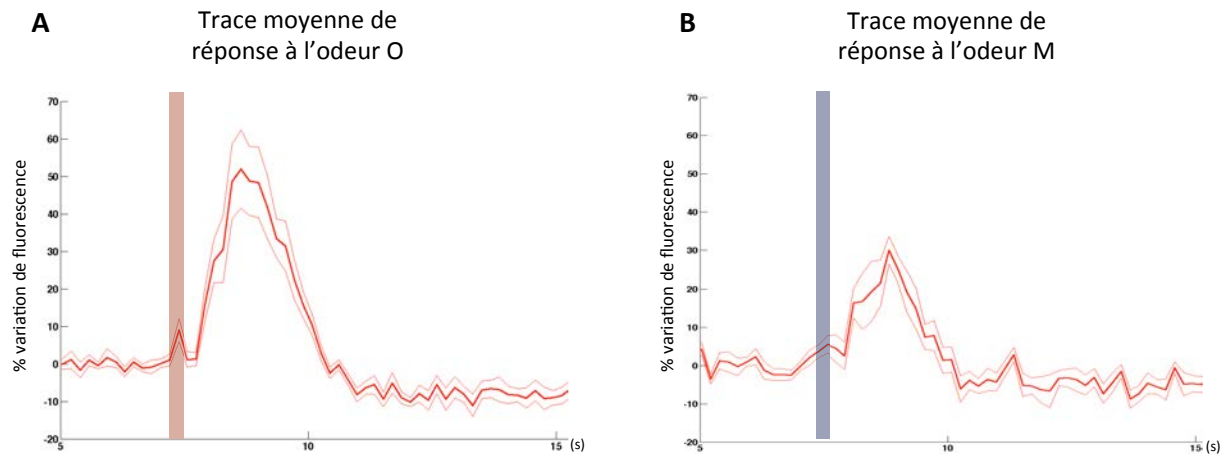


Figure 99 : Les neurones du Cluster 11 répondent à la présentation de molécules odorantes

L'activité des neurones du Cluster 11 a pu être mesurée dans des drosophiles de génotype 37G11/UAS-GCaMP3. Chez ces individus, j'ai pu mesurer les variations de signal GCaMP3, donc de concentration calcique, en conséquence de présentation d'odeurs (3-Octanol (O) ou 4-méthyl-cyclohexanol (M)). Chez des drosophiles naïves, la réponse à l'odeur O (A) semble être de plus grande amplitude que la réponse à l'odeur M (B) (n= 6 individus enregistrés).

On peut d'ores et déjà s'apercevoir que les drosophiles répondent aux deux odeurs classiquement utilisées en comportement, et il semblerait que l'amplitude des réponses à l'odeur 3-Octanol soit plus importante que celles des réponses au 4-Méthyl-cyclohexanol.

La poursuite de cette étude, et notamment la réponse aux odeurs à 3 heures après conditionnement, situation mimant le rappel de la MMT, est en cours.

III. Etude des neurones dopaminergiques oscillants MV1/MP1 en contexte mutant pour le gène *radish*

En début de thèse, j'ai participé à un projet de notre laboratoire portant sur le contrôle de la formation de la MLT aversive par les neurones dopaminergiques MV1 et MP1. Ce travail a été publié dans la revue Nature Neuroscience (Plaçais et al., 2012) et l'article complet est présenté en annexe.

Dans ce projet, des neurones dopaminergiques ont été identifiés comme permettant d'orienter la formation de mémoire consolidée vers la MRA ou la MLT, selon leur activité. Cela s'inscrit dans le cadre de l'antagonisme LT-ARM/MLT où l'engagement dans la

formation de MLT bloque la formation de LT-ARM et inversement (Isabel et al., 2004). Ainsi, le blocage de la neurotransmission des neurones dopaminergiques MV1/MP1 pendant les intervalles de repos d'un conditionnement espacé conduit à la formation de LT-ARM en lieu et place de la MLT. Il a même été montré que c'est par une activité rythmique qui se renforce au fil des conditionnements espacés que ces neurones MV1/MP1 lèvent l'inhibition de la formation de la MLT. De plus, nous avons montré que lorsqu'ils sont bloqués, la formation de MT-ARM est augmentée dans le cadre d'une expérience à Moyen Terme, confortant l'idée que ces neurones assument l'aiguillage vers l'une ou l'autre des mémoires consolidées.

C'est dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier si la mutation *radish* affectait les processus en jeu, puisque le gène *radish* est connu pour être impliqué dans la MRA (Folkers et al., 1993). Le gène *radish* (anciennement CG15720 et désormais référencé comme CG42628) code une protéine dont la fonction n'est pas encore complètement comprise, mais qui comprend des séquences phosphorylables par la PKA (Folkers et al., 2006) et qui se lierait à Rac1, une petite GTPase régulant les réarrangements du cytosquelette (Formstecher et al., 2005). En outre, la protéine *radish* est fortement exprimée dans les CP, ainsi que dans le corps ellipsoïde et le complexe central (Folkers et al., 2006). Comme le montre la Figure 100, j'ai pu vérifier que le blocage des neurones dopaminergiques conduit à une augmentation de la MT-ARM à 3 heures (+/TH-Gal4, UAS-Shi comparé à Canton S). J'ai aussi pu montrer que l'augmentation de mémoire se retrouve chez des drosophiles hétérozygotes (femelles, perte de fonction partielle) ou hémizygotés (mâles, perte de fonction totale) pour *radish*, lorsque l'on bloque les neurones dopaminergiques.

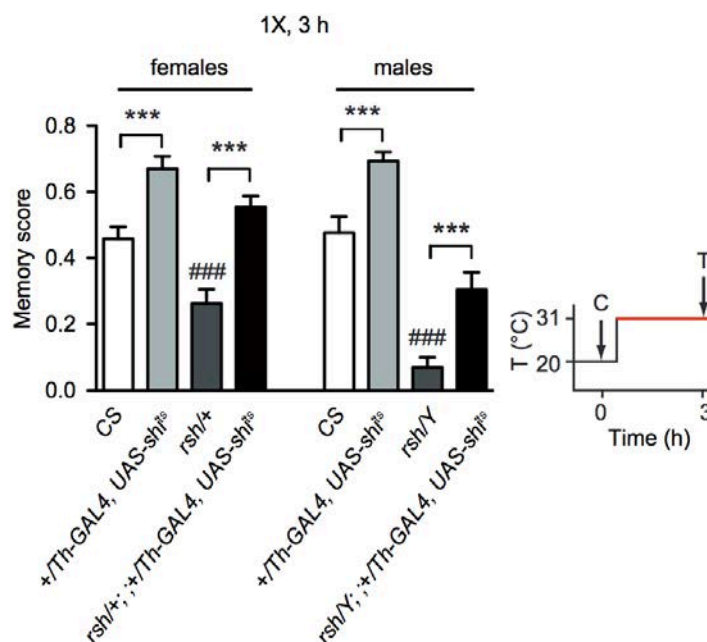


Figure 100 : L'effet des neurones dopaminergiques MV1/MP1 sur le contrôle de la MRA est indépendant de *radish*

La présence de la mutation radish n'empêche pas de former une mémoire additionnelle lorsque les neurones dopaminergiques sont bloqués après conditionnement (Femelles: $F(3,66) = 20.59$; $p < 0.0001$; $n \geq 16$; Mâles: $F(3,62) = 40.93$; $p < 0.0001$; $n \geq 15$; les symboles # indiquent le niveau de significativité lors du test post-hoc entre rsh/+ (respectivement rsh/Y) et Canton S).

Ensuite, pour apporter une preuve supplémentaire à l'indépendance des processus de contrôle de la formation de MRA vis à vis de *radish*, nous nous sommes intéressés au phénotype de ce mutant *radish* en imagerie calcique. C'est à dire que nous avons imagé les neurones dopaminergiques oscillants afin de voir s'ils présentaient toujours une activité spontanée, et le cas échéant si les caractéristiques de cette activité étaient changées.

J'ai pu observer que l'activité spontanée des neurones MV1 et MP1 chez le mutant *radish* ne sont pas significativement différentes de celles des individus sauvages, tant en terme d'occurrence qu'en terme d'amplitude moyenne (Figure 101).

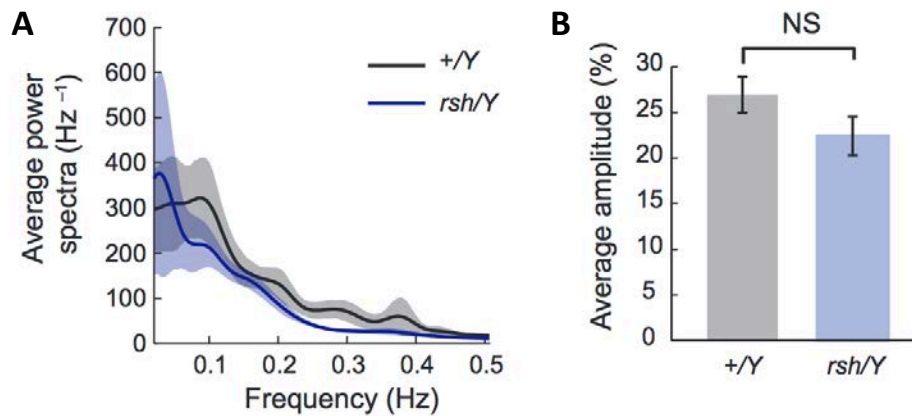


Figure 101 : Les oscillations spontanées des neurones dopaminergiques MV1/MP1 ne sont pas affectées par la mutation *radish*

L'activité spontanée des neurones MV1 et MP1 est similaire entre les mâles sauvages ou radish naïfs. Dans les deux cas, l'activité oscillante s'étend sur une bande de fréquence large, donnant lieu à un spectre de puissance non focalisé (A)(+/Y: n = 7, 4 individus avec activité rythmique; rsh/Y: n = 6, 3 individus avec activité rythmique). Les amplitudes moyennes des oscillations sont aussi similaires (B) ($p = 0.15$).

En conclusion, ces expériences de comportement et d'imagerie *in vivo* ont apporté de façon complémentaire la preuve que le mécanisme de contrôle de la balance MRA/MLT par les neurones dopaminergiques n'est pas affecté par la mutation *radish* et se tient à un niveau différent. Cependant, il n'a jamais été montré que *radish* est requis physiologiquement pendant la formation de mémoire. De même, l'implication physiologique de *radish* n'a jamais pu être localisée dans une population neuronale précise. Il pourrait par contre être instructif d'étudier l'effet d'autres mutations affectant spécifiquement la MRA sur l'activité des neurones MV1 et MP1, comme la mutation *dunce* par exemple (Scheunemann et al., 2012).

Discussion

I. Circuits du rappel des mémoires à long terme aversive et appétitive

Pour commencer, nous allons dresser le bilan de nos études du rappel des MLT aversive et appétitive, en soulignant leurs apports relativement à la littérature, ainsi que les points qui ont suscité le plus de réflexion. Nous ferons ensuite une synthèse comparative du rappel des MLT aversive et appétitive.

I.1 Avancées sur la caractérisation des réseaux neuronaux du rappel de la MLT aversive

Après l'étape de re-test, nous avons pu tirer des conclusions définitives quant aux types cellulaires requis et raisonner en terme de réseaux.

I.1.1 L'implication des Cellules de Kenyon α/β est acquise

Les KC α/β sont reconnues comme étant nécessaires lors du rappel de la MLT aversive (Isabel et al., 2004). La confirmation du défaut obtenu avec la lignée MB008B nous a permis conforter ce résultat (Figure 66).

Cependant, la question du rôle des différentes sous-populations de KC α/β dans le rappel de la MLT aversive se pose depuis la description des sous-divisions α/β *surface*, *postérieur* et *cœur* (Aso et al., 2009; Tanaka et al., 2008). Dans Huang et al., 2013, les auteurs se sont penchés sur cette question et ont observé, grâce aux pilotes Gal4 à leur disposition, que le rappel de la MLT aversive était affecté en bloquant les KC α/β *surface* et *postérieur* ensemble, mais pas en bloquant les KC α/β *postérieur* seules ni les KC α/β *cœur* seules (Figure 102).

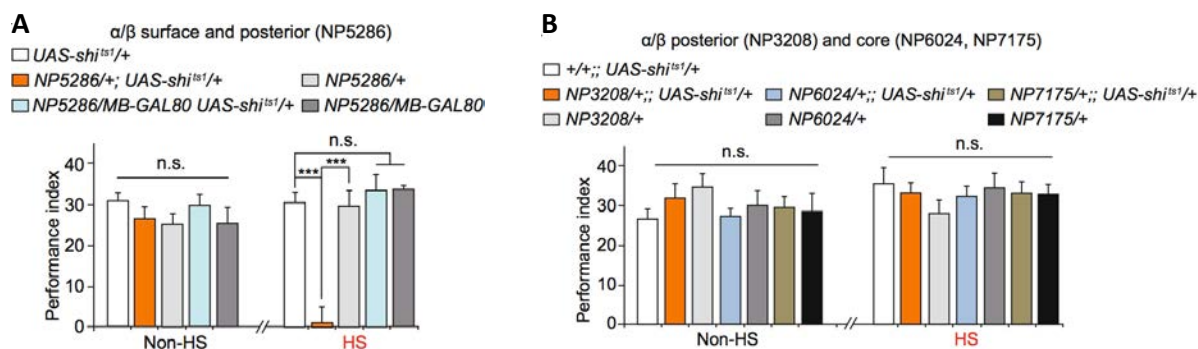


Figure 102 : Les Cellules de Kenyon α/β surface et postérieure sont requises ensemble

Le blocage des KC α/β surface et postérieure par l'effecteur UAS-Shibire^{1s} à température restrictive pendant le test induit un défaut de MLT aversive (A). Par contre, ni le blocage des KC α/β postérieure ou cœur individuellement ne produit de défaut (B) (scores en %) (Huang et al., 2013).

L'objectif de notre étude avec les lignées Split-Gal4 était également d'étudier les rôles individuels de chacun des sous-types. Avec les lignées à notre disposition, nous avons confirmé que le blocage des neurones α/β postérieure seuls n'a pas d'effet (Figure 103 B), tout comme le blocage des neurones α/β cœur seuls (Figure 103 C). Nous avons par contre deux lignées permettant d'apporter une information supplémentaire à celles de Huang et al, celles marquant les KC α/β surface et cœur externe. Ces lignées n'ayant pas montré de défaut, cela nous permet de conclure que le blocage des neurones α/β surface seuls n'affecte pas le rappel de la MLT aversive de façon significative (Figure 103 E) et qu'il faut donc bien bloquer au moins les neurones α/β surface et postérieure ensemble pour observer l'effet, comme l'avaient montré Huang et al (Figure 103 D).

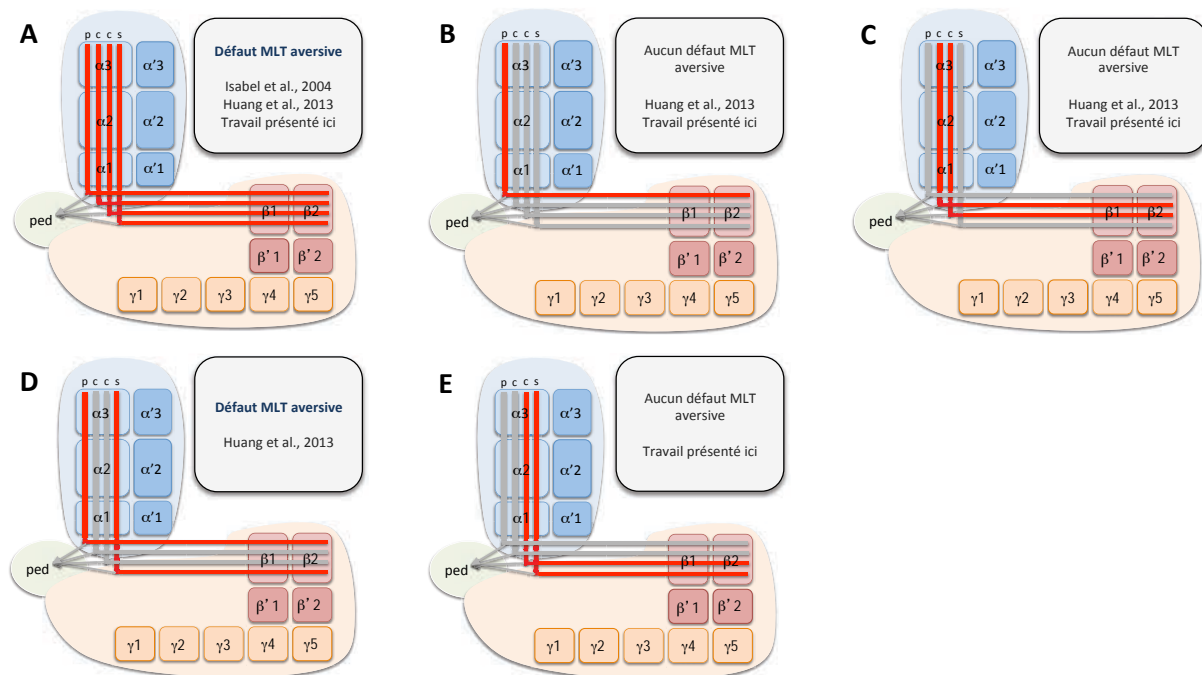


Figure 103 : Bilan du blocage des combinaisons de KC pendant le rappel de la MLT aversive

Le blocage de toutes les KC α/β induit un défaut de MLT aversive (A). Le blocage des KC α/β postérieur n'induit pas de défaut (B). Le blocage des KC α/β cœur n'induit pas de défaut (C). Le blocage des KC α/β postérieur et surface ensemble induit un défaut (D). Le blocage des KC α/β surface et cœur externe n'induit pas de défaut (E).

1.1.2 L'ensemble des MB-V2 participe au rappel de la MLT aversive

1.1.2.1 Nécessité de tous les MB-V2 dans le rappel

La lignée MB052B a présenté un défaut spécifique de rappel de MLT aversive (Figure 68), ce qui vient confirmer l'implication des neurones MB-V2, déjà publiée (Séjourné et al., 2011). En outre, MB052B est la seule lignée marquant les neurones MB-V2 à présenter un défaut et c'est aussi la seule à marquer le cluster des neurones MB-V2 tout entier (MB-V2 α et MB-V2 α'). Cela nous a laissé penser qu'il pourrait exister une redondance fonctionnelle au sein des neurones MB-V2, et que le blocage de l'un puisse être compensé par l'activité des autres.

Ceci dit, cela constitue une contradiction avec ce qui avait été documenté jusque là : un défaut de mémoire avait pu être obtenu en bloquant les neurones MB-V2 α seuls (grâce au pilote MZ160) pendant le rappel de la MLT aversive (Séjourné et al., 2011). C'est aussi pour

lever cette contradiction que nous avons testé la lignée supplémentaire triple Split 65B09;MB062C marquant de façon certaine tous les neurones MB-V2 α . Le fait qu'elle ne donne lieu à aucun défaut de rappel accrédite notre conclusion de l'existence d'une redondance fonctionnelle au sein des neurones MB-V2, au détriment de la thèse de l'absolue nécessité des neurones MB-V2 α .

En outre, dans l'article collaboratif de JFRC (Aso et al., 2014b), une autre approche expérimentale est informative quant au fonctionnement des neurones MB-V2. Il s'agit de l'activation de neurones cibles via CSChrimson, une *channelrhodopsin* photoactivable par la lumière rouge. Un résultat similaire au nôtre a été obtenu : parmi les lignées adressant le *Cluster* MB-V2, seule la lignée MB052B qui marque l'ensemble du *Cluster* a permis d'observer l'effet d'attraction (Figure 104). Cela renforce la thèse que les neurones MB-V2 fonctionnent en tant qu'ensemble.

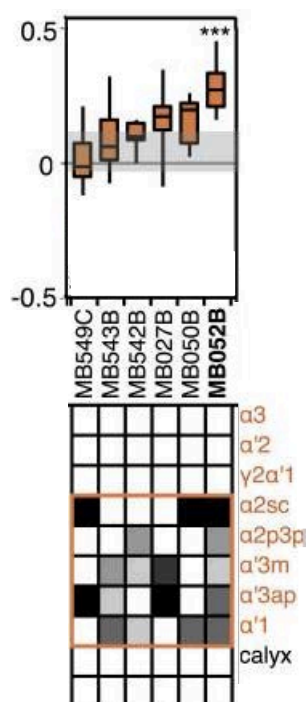


Figure 104 : L'activation des MB-V2 par CSChrimson génère une attraction seulement quand tous les MB-V2 sont manipulés

L'activation de certains neurones génère un comportement d'attraction (préférence positive à la lumière rouge). C'est le cas de la lignée MB052B marquant tous les MB-V2, mais d'aucune autre lignée marquant des sous-ensembles du cluster MB-V2.

1.1.2.2 Questions relatives à l'existence de redondance fonctionnelle dans le cluster MB-V2

Notre résultat soulève plusieurs problèmes.

Tout d'abord, le blocage de la sortie des KC α/β est suffisant pour induire un défaut de MLT, alors que nous montrons ici que le blocage des MB-V2 α seuls n'est pas suffisant.

Cela peut impliquer que la nécessité des KC α'/β' a été sous évaluée, ou bien que les neurones MB-V2 α et α' sont interconnectés. En effet, s'ils sont interconnectés, par des jonctions communicantes par exemple, même si les neurones MB-V2 α sont bloqués au niveau synaptique, ils peuvent toujours transmettre la variation de potentiel membranaire aux neurones MB-V2 α' qui eux ne sont pas bloqués et peuvent conduire à l'exécution du comportement.

Cependant, nous avons également montré dans le projet sur les neurones de la CL en aval des MB-V2 que le blocage du *Cluster 11* était suffisant pour affecter la MLT, alors qu'il est censé être en aval des MB-V2 α seulement. Il est difficile de comprendre comment le blocage des MB-V2 α ne peut être suffisant pour affecter la mémoire alors que le blocage des neurones en aval est, lui, suffisant. L'hypothèse de l'existence de jonctions communicantes ne permet pas de régler cette incohérence. Il faudrait faire l'hypothèse supplémentaire que les MB-V2 α' contactent également les neurones du *Cluster 11* et cela méritera d'être étudié par approche de co-marquage.

1.1.3 Débats sur la participation des neurones MB-V3 et MB-V4 au rappel de la MLT aversive

Deux lignées, MB082C et MB093C marquant à la fois les neurones MB-V3 et MB-V4 ont présenté un défaut lors de l'étape de criblage initial. Cependant, tandis que la lignée MB082C a passé tous les contrôles avec succès, la lignée MB093C n'a pas confirmé son défaut lors du re-test (Figure 70). Il est à noter que le criblage initial a été effectué sans les contrôles parentaux Split-GAL4/+ ; aussi nous privilégions les résultats obtenus lors de la phase de re-test avec les deux contrôles appropriés. Cela étant, il convient de déterminer si MB082C est un faux positif ou si MB093C un faux négatif. Plusieurs arguments nous incitent à favoriser la première hypothèse :

1) Des données obtenues dans notre équipe avec le pilote d'expression G0239 (Figure 105) montrent que les neurones MB-V3 ne sont pas requis pour le rappel de la MLT aversive (Plaçais et al., 2013). D'autre part, concernant les neurones MB-V4, aucune autre lignée Split-Gal4 les marquant n'a présenté de défaut.

2) J'ai montré que la lignée MB082C donnait un fort défaut après un conditionnement massé, alors que deux études concordantes montrent que les neurones MB-V3 et MB-V4 ne sont pas requis pour la MRA à 24 heures (Plaçais et al., 2013 ; Pai et al., 2013).

3) Les expériences complémentaires réalisées avec les lignées ayant permis de générer les « héli-splits » de MB082C n'ont pas produit de défaut de MLT.

L'ensemble de ces arguments nous conduit à soupçonner que le défaut obtenu avec la lignée MB082C n'est pas dû aux neurones MB-V3 et MB-V4. L'origine de ce défaut reste cependant inconnue, la probabilité la plus forte étant l'existence d'un autre marquage non identifié dans cette lignée. En ce qui concerne les neurones MB-V3 et MB-V4, nous concluons qu'ils ne sont probablement pas impliqués dans le rappel de la MLT aversive.

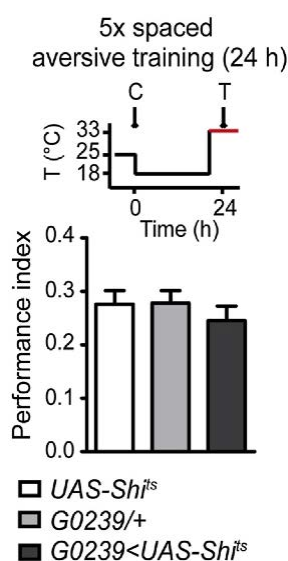


Figure 105 : Les neurones MB-V3 ne sont pas requis dans le rappel de la MLT aversive

Le blocage des neurones MB-V3 grâce au pilote d'expression G0239 n'induit pas défaut de MLT aversive (Plaçais et al., 2013)

1.1.4 Les DPM sont requis lors du rappel, mais quid du mécanisme en jeu?

Par mes expériences, j'ai pu confirmer et renforcer (en vertu de l'utilisation du pilote d'expression VT64246, plus spécifique que ceux précédemment utilisés) le fait que les neurones DPM soient impliqués eux-aussi dans le rappel de la MLT aversive.

Il a été montré qu'ils répondent aux odeurs et aux chocs électriques, et qu'ils forment même une trace calcique à court terme (Yu et al., 2005). Dès lors, il nous a paru évident de tester si une trace mnésique calcique existait dans le cadre de la MLT aversive. Il s'est avéré au final (Figure 87) que nous n'avons pas pu établir l'existence de trace calcique, malgré l'existence d'une tendance. De façon inattendue, cette tendance allait dans le sens opposé à la trace à court terme observée par Yu et al., 2005.

Les neurones DPM sont des neurones particuliers, dans le sens où ils sont à la fois pré- et post-synaptiques aux KC et qu'ils sont impliqués dans de nombreux processus mnésiques, que ce soit donc le rappel, mais aussi dans la consolidation de la MRA à moyen et long terme (Lee et al., 2011), et dans la consolidation de la mémoire appétitive (Keene et al., 2006). Bien que nos résultats puissent s'intégrer dans ce tableau complexe, en gardant en toile de fond l'antagonisme MRA-MLT, nous n'avons pas actuellement à notre disposition les moyens d'appréhender plus que cela leur fonctionnement.

Nous espérons que dans un futur proche, des expériences d'imagerie à résolution infra-cellulaire puisse permettre de rechercher des effets à des synapses précises, et non à l'échelle des neurones DPM entiers, sachant qu'ils couvrent l'ensemble des lobes et doivent y former une multitude de synapses.

1.2 Avancées sur la caractérisation des réseaux neuronaux du rappel de la MLT appétitive

A l'issue du primo-criblage, de nombreux types cellulaires candidats ont été proposés comme ayant un rôle dans le rappel de la MLT appétitive. Lors de la réalisation des différents contrôles, nous avons assisté à un écrémage drastique des types neuronaux impliqués. Nous allons discuter de ceux qui ont retenu particulièrement notre attention.

1.2.1 Vers une caractérisation affinée des Cellules de Kenyon α/β requises lors du rappel de la MLT appétitive

Le premier type neuronal « survivant » correspond aux KC α/β , que nous avons pu confirmer grâce aux lignées MB008B (Figure 78) et MB594B (Figure 79). La lignée MB008B nous permet de conclure que tout ou partie du *cluster* des KC α/β est requis (Figure 106 A). Le défaut proposé par la lignée MB594B apporte en outre que, au sein du cluster, les KC *coeur* sont indispensables (Figure 106 D). Cela n'exclut évidemment pas une participation des autres KC α/β . Comme en aversif, nous n'avons pas la possibilité de tester la nécessité des KC α/β *postérieur* et *surface* ensemble, mais Huang et al. ont montré que ces dernières étaient nécessaires ensemble (Figure 106 C). De plus, le blocage des KC α/β *postérieur* seules n'est pas suffisant pour affecter la mémoire (Figure 106 B).

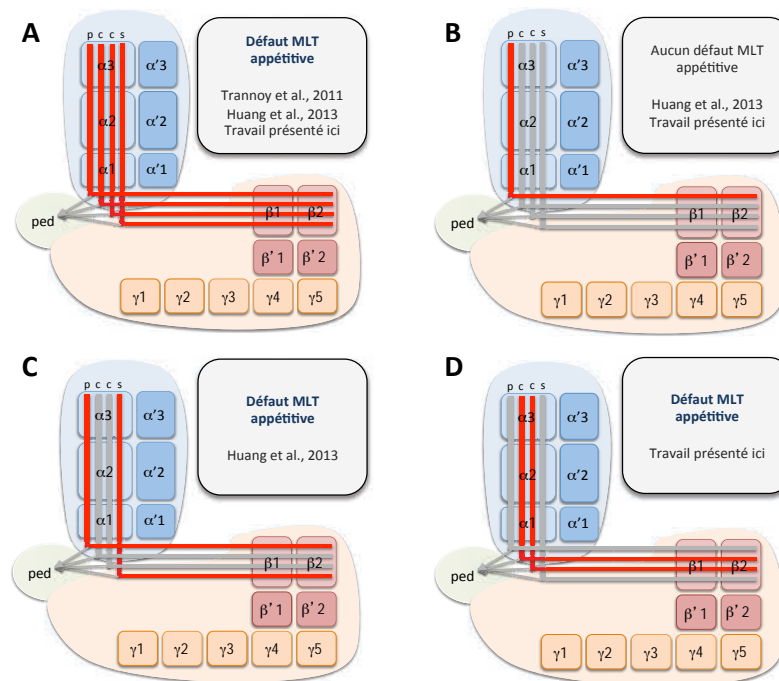


Figure 106 : Bilan du blocage des combinaisons de KC pendant le rappel de la MLT appétitive

*Le blocage de toutes les KC α/β induit un défaut de MLT appétitive (A). Le blocage des KC α/β *postérieur* n'induit pas de défaut (B). Le blocage des KC α/β *postérieur* et *surface* ensemble induit un défaut (C). Le blocage des KC α/β *coeur interne et externe* induit un défaut (D).*

Le fait que la MLT appétitive « sorte » des KC α/β , prises dans leur ensemble, s'accorde parfaitement avec les données déjà publiées par notre équipe (Trannoy et al., 2011) ou par d'autres (Huang et al., 2013) (Figure 107 A).

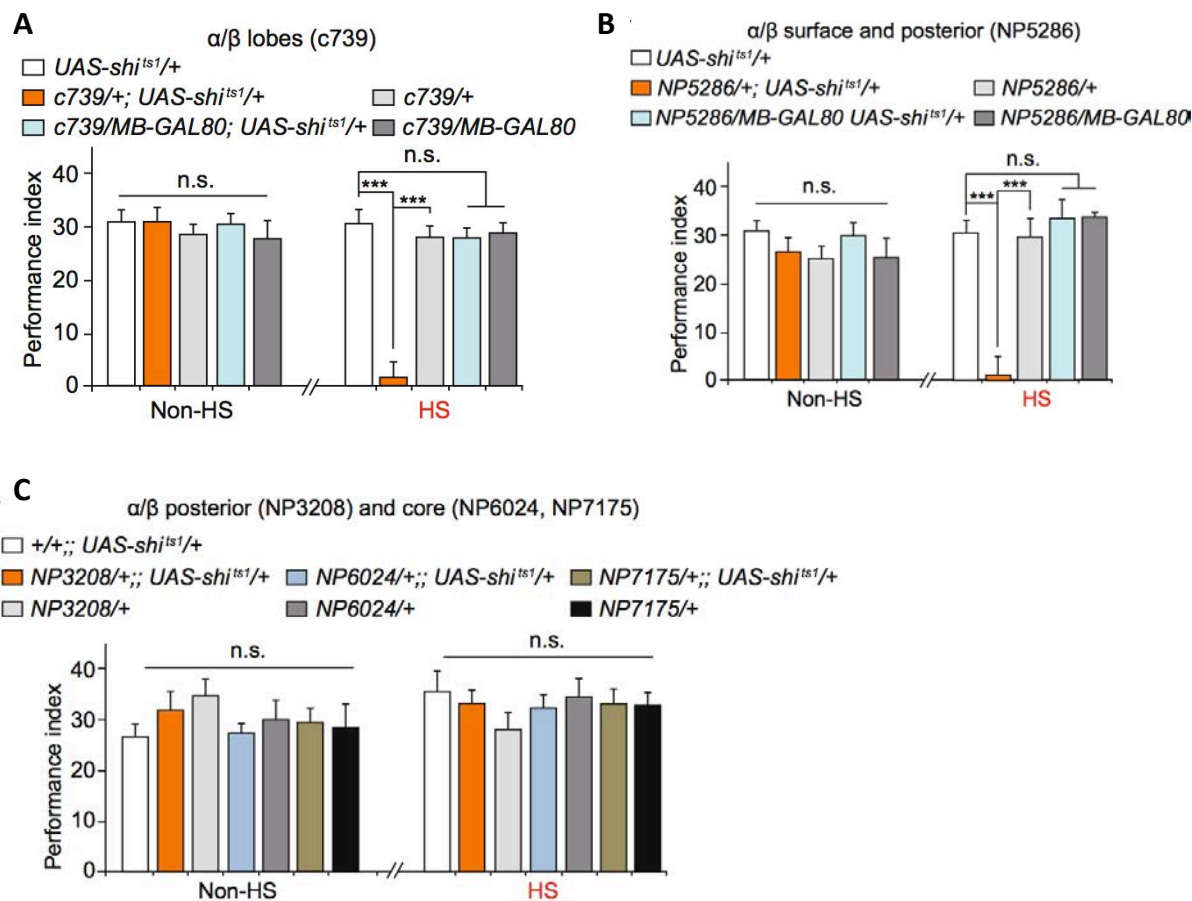


Figure 107 : Dissection des Cellules de Kenyon requises pour le rappel de la MLT appétitive

Le blocage, pendant le rappel de la MLT appétitive des KC α/β dans leur ensemble (A) ou des KC α/β surface et postérieur (B) conduit à un défaut de MLT appétitive, mais à aucun défaut dans le cas des KC α/β postérieur et coeur simultanément (C) (scores en %) (Huang et al., 2013).

Par contre, le fait que nous obtenions un défaut avec la lignée MB594B constitue une contradiction avec le résultat présenté en Figure 107 C, où les auteurs n'observent rien avec des lignées marquant les KC α/β coeur. Une possibilité demeure tout de même que dans leur cas, les lignées utilisées ne marquent pas les deux sous-populations α/β coeur décrites par JFRC, les coeur interne et externe.

Les lignées MB419B (pour les KC γ dorsal), et MB370B et M418B (pour les KC α'/β') ont présenté des défauts de réponse au sucre ou mémoire à température permissive en faisant de probables faux positifs. Cela ne cause donc pas de contradiction avec la littérature, qui établit que ni les KC γ ni les KC α'/β' ne participent au rappel de la MLT appétitive (Trannoy et al., 2011).

1.2.2 Les MB-V3 sont définitivement requis pour le rappel de la MLT appétitive

Concernant le *cluster* MB-V3/MB-V4, nous avons soumis deux lignées aux différents contrôles : MB082C et MB093C (MB093C n'était pas « sortie » lors du criblage initial, mais nous suspicions un faux-négatif, l'implication des neurones MB-V3 étant déjà publiée (Plaçais et al., 2013)). La lignée MB082C a présenté un défaut de réponse au sucre (Figure 82), l'excluant. En revanche, la lignée MB093C a franchi toutes les étapes de contrôle pour confirmer la participation des neurones MB-V3 (Figure 80).

En ce qui concerne les autres neurones efférents aux lobes α , nous avons pu constater une absence de défaut lors du re-test pour la lignée MB310C marquant les neurones *Output* α_1 , un défaut de sucre pour la lignée MB052B marquant les neurones MB-V2 et un défaut d'olfaction pour la lignée MB542B marquant également un sous-ensemble des neurones MB-V2 (Figure 82). Même si ces résultats n'excluent pas totalement que ces neurones puissent être impliqués, il n'y a donc aucune raison de suspecter l'implication de ces neurones.

Ainsi, les neurones MB-V3 seraient les seuls neurones efférents au lobe α à être requis pour le rappel, de manière cohérente avec une efférence des KC α/β pour le rappel mnésique à long terme appétitif. De plus, dans l'article Plaçais et al., 2013, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'une trace mnésique à Long Terme (Figure 108). Cela est compatible avec le fait que ces neurones soient essentiels au rappel et avec l'hypothèse qu'ils soient les seuls. A l'inverse, si aucune trace n'avait pu être décelée, nous n'aurions pas pu croire qu'ils soient les seuls à assumer le rappel de la MLT appétitive.

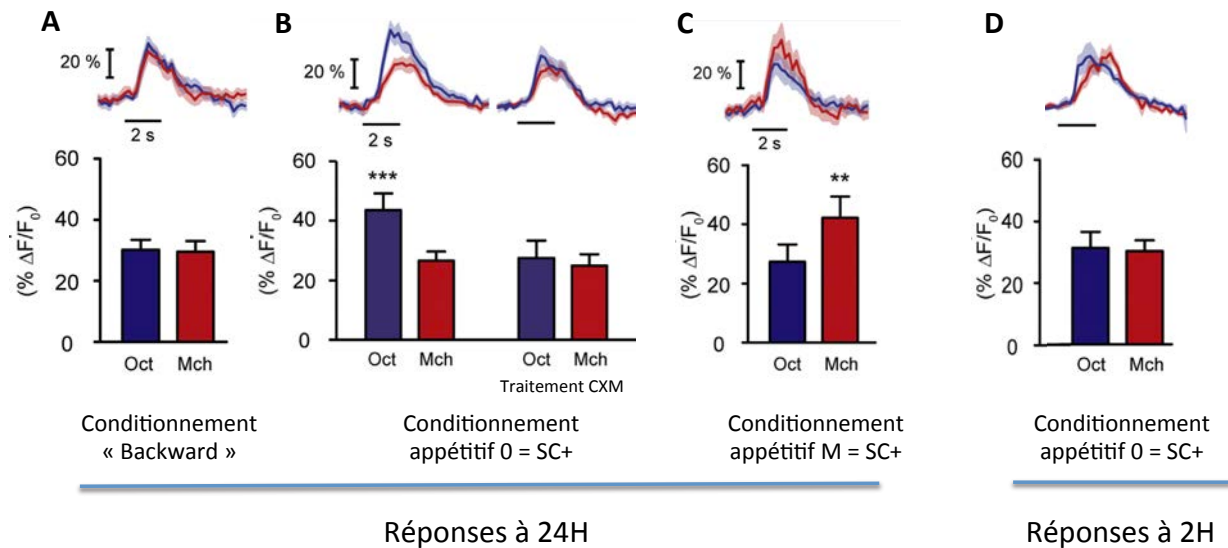


Figure 108 : Les neurones MB-V3 renferment une trace mnésique spécifique de la MLT appétitive

Les neurones MB-V3 présentent une réponse calcique aux odeurs chez des drosophiles naïves, révélées par la GCaMP3 (A). Après conditionnement appétitif, ces neurones montrent une réponse augmentée à l'odeur SC+ à 24h après conditionnement (B et C). Cette trace mnésique est abolie avec un traitement par la cycloheximide (CXM) (B). En revanche, aucune trace n'est présente seulement 2 heures après le conditionnement (D). Tous ces éléments démontrent que la trace est spécifique de la MLT appétitive.

1.2.3 Incertitude quant à l'implication des neurones Outputs $\beta 2\beta'2a$ dans le rappel de la MLT appétitive

Notre travail en MLT appétitive avec la lignée MB399B a suggéré un rôle des neurones Output $\beta 2\beta'2a$.

Cependant, il s'avère au final que pour le rappel de la MLT appétitive, si les deux lignées Split-Gal4 (MB399B et MB074C) présentent un défaut (Figure 81 et Figure 84), deux lignées Gal4 non-split (12C11 et VT46095) n'en présentent pas (Figure 83).

En outre, pour contrôler la spécificité des neurones Outputs $\beta 2\beta'2a$ pour le rappel de la MLT appétitive, nous avons testé l'effet de leur blocage sur le rappel de la MMT appétitive. Nous avons alors observé que l'une des lignées Split-Gal4 (MB399B) présentait un défaut spécifique quand l'autre (MB074C) n'en présentait pas (Figure 85). Nous en concluons que l'une des deux lignées Split-Gal4 n'est pas fiable, sans toutefois avoir d'explication satisfaisante.

L'impossibilité d'obtenir deux lignées présentant des défauts cohérents en conséquence du blocage des neurones *Outputs* $\beta 2\beta'2a$ nous a conduit à arrêter cette étude.

I.3 Comparaison des réseaux du rappel des MLT aversive et appétitive

Nous pouvons maintenant procéder à la comparaison des réseaux proposés par nos études aversive et appétitive, ce qui était l'idée de départ.

Sous un angle global, il apparaît que les circuits sont différents. Le rappel de la MLT aversive nécessite absolument la neurotransmission des KC α/β surface et postérieur, ainsi que des neurones efférents MB-V2. Par contre, la MLT appétitive dépend au moins des KC α/β cœur et des neurones efférents MB-V3. On peut tout de même noter dans le cas de la MLT appétitive que le défaut est plus prononcé quand toutes les KC α/β sont bloquées (par rapport aux KC α/β cœur seulement) : ceci suggère que d'autres KC α/β puissent participer, même si leur blocage isolé n'est pas suffisant pour affecter la mémoire.

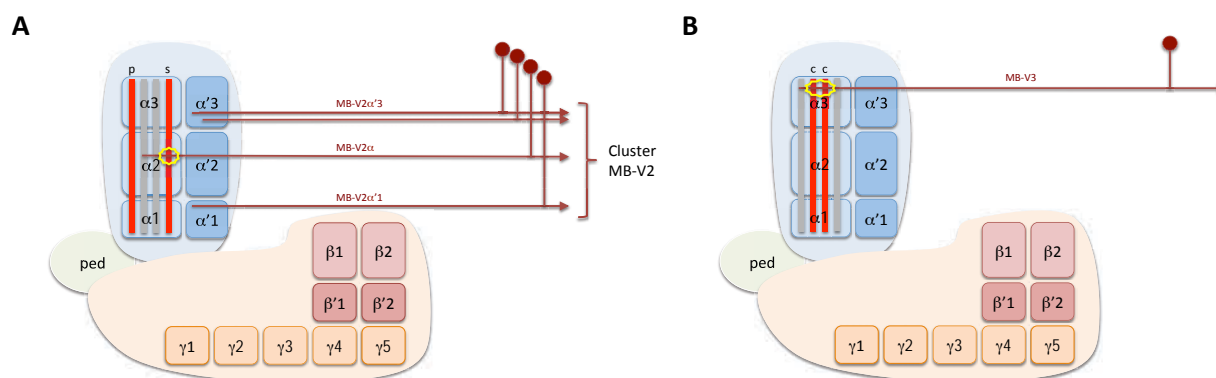


Figure 109 : Vision schématique des circuits du rappel des MLT aversive et appétitive

(A) Pour le rappel de la MLT aversive, les KC α/β postérieur et surface sont requises, ainsi que les neurones efférents MB-V2. Leur communication s'effectue nécessairement au niveau des lobes verticaux, et plus précisément au niveau du module $\alpha 2$, depuis la sous-population de KC α/β surface vers la sous-population de MB-V2 α .

(B) Pour le rappel de la MLT appétitive, ce sont les KC α/β cœur qui sont requises, ainsi que les neurones MB-V3. Ils établissent des contacts au niveau du module $\alpha 3$ des lobes verticaux.

Les résultats de Perisse et al., 2013 méritent d'être intégrés à cette réflexion. Nous pensons que dans leurs travaux, la mémoire appétitive observée à 3 heures est une forme précoce de MLT car ils montrent qu'elle dépend d'une activité synaptique des KC α/β . Si

cette hypothèse est vraie, leurs résultats vont dans le même sens que les nôtres, puisque le blocage des KC α/β cœur seules affecte la mémoire.

En conclusion, notre approche a permis de confirmer que les réseaux que l'on implique dans les mémoires appétitives et aversives sont différents. En conséquence, les mémoires aversive et appétitive ne relèveraient pas d'un encodage de valence opposée dans une même population neuronale. Au contraire, il semble que les KC α/β cœur encodent spécifiquement la MLT appétitive.

II. Discussion critique sur l'approche systématique et exhaustive employée.

II.1 Les objectifs de caractérisation exhaustive des réseaux neuronaux du rappel des MLT sont-ils atteints ?

L'objectif posé à l'origine de ce projet était simple : identifier ou confirmer tous les types neuronaux impliqués dans l'étape de rappel des MLT.

Que ce soit pour la MLT aversive ou la MLT appétitive, nous avons en effet par notre approche reproduit des résultats déjà publiés, et ce de façon indépendante. En effet, les pilotes d'expression utilisés sont, outre le fait d'être plus spécifiques, pour la plupart indépendants de ceux utilisés dans les travaux ayant découvert l'implication de différents types neuronaux. Par exemple, la lignée MB008B est indépendante génétiquement des lignées c739 ou MB247 ayant initialement conduit à inférer un rôle aux KC α/β , la lignée MB052B est indépendante des lignées MZ160 ou NP2492 marquant les neurones MB-V2 et la lignée MB093C est également indépendante de la lignée G0239 adressant les neurones MB-V3. Cela constitue donc la première force de ce travail, la réplication de résultats récents permettant de les asseoir et d'en faire une base de travail solide pour le futur.

Cependant, nous avons également en tête un second objectif de découverte de nouveaux types neuronaux impliqués, pour alors ouvrir la porte à des explorations plus poussées quant à leur physiologie. En MLT aversive, nous n'avons finalement identifié aucun nouveau type neuronal, et en MLT appétitive également, nous ne sommes pas parvenus à identifier de manière certaine d'autres types neuronaux que les neurones MB-V3 déjà connus. Le fait que nous ayons découvert si peu de nouveaux types cellulaires impliqués peut indiquer que nous soyons proches de la saturation, ou, alternativement, que nous ayons laissé échappé un certain nombre de « vrais » positifs.

Par rapport à ce dernier point, notons tout de même que le blocage par UAS-Shi_{JFRC} est a priori fort, ayant permis d'obtenir de nombreux putatifs, et à tel point que des défauts à température permissive ont également été obtenus. On peut considérer, de ce fait, que l'utilisation de cette lignée a permis de diminuer le nombre de faux négatifs, même si l'on ne peut exclure que de par son expression forte ait pu induire des défauts développementaux.

Inversement, certains éléments montrent que le nombre de faux négatifs induits par l'approche Split-Gal4 peut parfois être important. Notamment, dans le criblage des neurones du rappel de la MMT aversive mené par nos collaborateurs (cf article Aso et al. en annexe, page 9 et 14 pour la MMT aversive), ni les MB-V2 ni les MB-M6 n'ont vu leur implication reproduite. Pourtant, en utilisant des lignées GAL4 non-Split provenant d'autres collections, l'implication de ces neurones a été montrée de manière difficilement discutable (Séjourné et al., 2011 et Bouzaiane et al., 2015 pour les neurones MB-V2, Oswald et al., 2015 et Bouzaiane et al., 2015, pour les neurones MB-M6). Dans le cas du travail de nos collaborateurs, il faut remarquer qu'ils ont utilisé non pas l'effecteur UAS-Shi_{JFRC}, mais UAS-Shi_{GDSM}, pour justement éviter trop de faux-positifs. Ces discordances avec la littérature suggèrent que les lignées Split-Gal4 peuvent aussi ne pas induire assez fortement l'expression de l'effecteur Shimore^{ls}. Il est donc envisageable que nous ayons manqué quelques types neuronaux requis pour le rappel des MLT appétitives et aversives.

En conclusion, dans le cas où il n'y aurait pas plus de type neuronal impliqué dans le rappel des MLT aversive et appétitive que ce qui est décrit ici, cela constituerait un accomplissement pour ce champ d'investigation. Cette caractérisation exhaustive méritera d'être menée pour chacune des phases (apprentissage, consolidation, rappel) des différents types de mémoire associative olfactive (ST-ARM, MCT, MT-ARM, MMT, LT-ARM, MLT), afin que l'on puisse se consacrer uniquement à la compréhension des mécanismes, le réseau en lui-même étant compris une bonne fois pour toutes.

II.2 Evaluation critique de l'approche Split-Gal4 systématique

Malgré les apports de ce projet initié par JFRC, nous nous sommes heurtés à certains problèmes.

En premier lieu, nous avons été frappés par le nombre de lignées qui ont été éliminées du fait de défaut de sucre et d'olfaction à température restrictive, ou de défaut de MLT à température permissive. Et parmi elles, certaines pointent des incohérences qui nous

interpellent. Par exemple, la lignée MB418B a présenté un défaut de réponse au sucre ayant conduit à son élimination (Figure 82), tandis que la lignée MB370B qui inclut les neurones marqués dans MB418B ne présente, elle, aucun défaut de réponse au sucre (Figure 110).

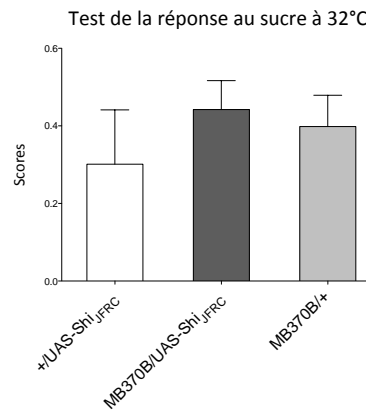


Figure 110 : La lignée MB370B ne présente pas de défaut de réponse au sucre

$$P_{ANOVA}=0,6184$$

Ceci indique un défaut non spécifique au blocage des neurones, mais imputable au fond génétique de la lignée MB418B. Nous ne l'avons pas vérifié pour des raisons de temps, mais il aurait été judicieux de vérifier si ce défaut de réponse au sucre est présent à température permissive, comme on s'y attend. A ce propos, nous pouvons aussi rappeler que les lignées Split-Gal4 n'ont pas été construites dans un fond génétique contrôlé, et n'ont pas fait l'objet de la procédure classique d'homogénéisation du fond génétique avec la souche sauvage de référence (« outcross » par Canton S) et que cela pourrait être une cause de ces problèmes non-spécifiques.

De même, on peut remarquer que la lignée MB074C a été éliminée en raison d'un défaut à température permissive (Figure 82), alors que la lignée MB399B, partageant avec elle les neurones *Output* $\beta 2\beta'2a$, n'en présente pas (Figure 81), et que la lignée MB210B partageant avec elle les neurones MB-M4 et MB-M6 n'a pas présenté de défaut à température restrictive lors du primo-criblage, donc très peu vraisemblablement de défaut à température permissive. Une fois encore, cela pourrait être imputable à un défaut non spécifique provenant de l'interaction entre le fond génétique de la lignée Split-Gal4 et celui de la lignée UAS-Shi_{JFRC}.

En conclusion, le développement de la collection de lignée Split-GAL4 laissait entrevoir l'espoir de pouvoir cibler très spécifiquement et de manière très reproductible chaque type de

neurones extrinsèques aux CP. Ces caractéristiques devaient permettre de simplifier grandement l'étude des réseaux neuronaux, en s'affranchissant des contraintes et sources d'erreur que constituait la non-spécificité des lignées Gal4 traditionnelles. A la lumière des problèmes et incohérences que nous avons rencontrés et soulevés ici, force est de constater que ces lignées ne constituent pas un outil parfait, et qu'il convient d'interpréter les résultats qu'elles produisent avec autant de précautions que ceux obtenus avec des lignées Gal4 traditionnelles. En particulier il reste absolument nécessaire d'obtenir des résultats concordants avec plusieurs lignées de patron d'expression semblable pour pouvoir tirer des conclusions.

III. Ouvertures relatives à nos travaux

L'ensemble des approches comportementales utilisées dans l'article collaboratif mené par JFRC (Aso et al. 2014b) ont permis de dresser un bilan général concernant le rôle des neurones efférents aux CP, relaté dans la Figure 111 et qui peut servir de base de réflexion pour cette discussion.

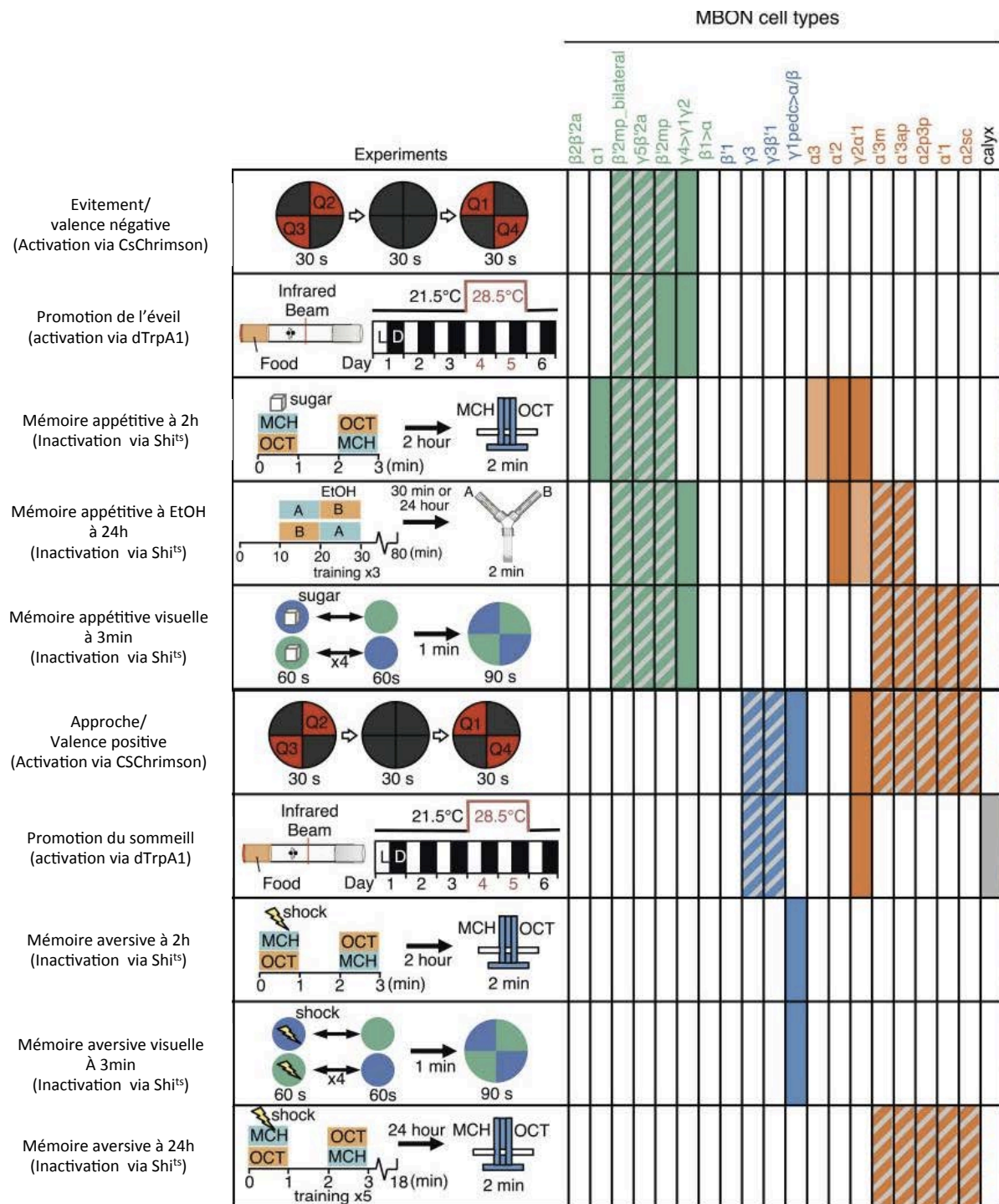


Figure 111 : Bilan des types neuronaux identifiés pour les différents comportements testés dans la collaboration JFRC

Pour chaque comportement testé sont présentés les types neuronaux efférents ayant pu être impliqués dans ce comportement. Une représentation schématique du paradigme expérimental utilisé pour tester chaque comportement est donnée, et les types neuronaux sont classés selon le neurotransmetteur employé (en vert glutamatergiques, en bleu GABAergiques et en orange cholinergiques). Le blocage des types neuronaux marqués en couleur pleine est

suffisant, individuellement, pour induire un phénotype, tandis qu'il faut bloquer l'ensemble des types neuronaux marqués hachurés pour générer un phénotype.

Nous pouvons remarquer plusieurs points. Tout d'abord, la valence de la réponse à l'activation des neurones efférents est hautement corrélé avec le neurotransmetteur utilisé : tous les neurones efférents dont l'activation, via CsChrimson, induisent un évitement sont glutamatergiques, tandis que tous les neurones efférents menant à une approche sont GABAergiques ou cholinergiques. De plus, si tous les neurones glutamatergiques impliqués dans le rappel mnésique le sont pour des mémoires appétitives (mémoire olfactive appétitive à 2 heures, mémoire appétitive à l'éthanol (EtOH) à 24 heures ou mémoire visuelle appétitive immédiate), tous les neurones GABAergiques sont associés à des mémoires aversives (mémoire olfactive aversive à 2 heures, mémoire visuelle aversive immédiate). Par contre, les neurones cholinergiques sont aussi bien impliqués dans le rappel de mémoires appétitives qu'avversives.

En outre, nous avons pu remarquer que les neurones glutamatergiques promoteurs de l'évitement sont également promoteurs de l'éveil, tandis que des neurones GABAergiques et cholinergiques, promoteurs de l'approche sont également promoteur du sommeil. Il apparaît donc une corrélation qui a vraisemblablement une signification écologique, le danger pouvant nécessiter un plus grand éveil.

Par ailleurs, le travail de caractérisation anatomique mené en parallèle de notre approche comportementale à JFRC (Aso et al., 2014a) a apporté de nombreuses informations permettant de réfléchir aux problématiques qui nous occupent. Notamment, la caractérisation des cibles des neurones efférents a été réalisée (Figure 112). La convergence anatomique des neurones efférents constitue un indice quant à leur fonction.

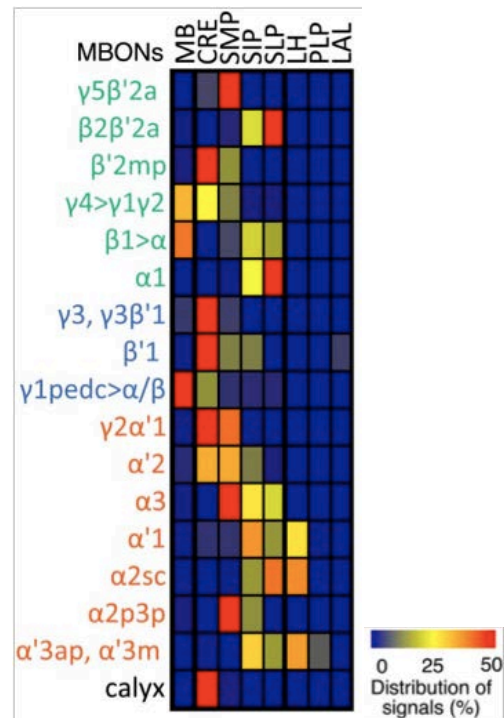


Figure 112 : Description des zones de projection des neurones efférents aux Corps Pédonculés

Le différents types de neurones efférents (en vert les glutamatergiques, en bleu les GABAergiques et en orange les cholinergiques) projettent sur 5 zones principales : Crepine (CRE, région entourant les lobes médians), le Protocerebrum Median Supérieur (SMP), le Protocerebrum Intermédiaire Supérieur (SIP), le Protocerebrum Latéral Supérieur (SLP) et la Corne Latérale (LH). Certains neurones efférents projettent en retour sur les Corps Pédonculés (MB) (PLP : Protocerebrum Postérieur Latéral ; LAL : Lobe Latéral accessoire) (Aso et al., 2014).

III.1 Zones de projections des neurones efférents

Aso et al. 2014 ont pu caractériser le lieu de projection des neurones efférents : tous ciblent certaines des cinq zones Crepine (CRE), Corne Latérale (LH), Protocerebrum Median Supérieur (SMP), Protocerebrum Intermédiaire Supérieur (SIP) et Protocerebrum Latéral Supérieur (SLP) (Figure 112). On peut imaginer que chacune de ces zones participe à coder différents aspects, ou modalités, de la « sortie » comportementale. Par exemple, on pourrait penser que parmi ces neuropiles certains soient spécialisés dans la promotion de l'attention, dans la motilité ou dans l'induction d'un virage. Différentes modalités pourraient donc, sous l'influence de la signalisation des neurones efférents, être biaisées afin d'induire un changement du comportement de la drosophile à l'arrivée d'un stimulus conditionné.

Parmi les zones ciblées par les neurones efférents, deux méritent d'être discutées plus en détail.

III.2 Projections sur la Corne Latérale

Tout d'abord, les neurones efférents MB-V2 présentent des projections sur la CL. Connaissant le rôle de la CL dans l'évitement inné des odeurs aversives (Jefferis et al., 2007), cela suggère une modulation de cette réponse innée par les MB-V2, induisant la réponse comportementale liée à l'apprentissage. Puisque l'activation des neurones MB-V2 induit un comportement d'approche, on peut supposer que l'action des neurones MB-V2 sur la CL soit globalement inhibitrice de la fonction de celle-ci. Étant donné que les neurones MB-V2 sont cholinergiques (Aso et al., 2014a; Séjourné et al., 2011), un neurotransmetteur majoritairement excitateur chez les insectes, il est probable que cette inhibition ne soit pas directe mais implique un étage neuronal supplémentaire mettant en jeu une neurotransmission inhibitrice.

Curieusement, aucun neurone projetant sur la CL n'a été identifié pour le rappel de la MLT appétitive. Cela peut vouloir dire que pour la mémoire appétitive la sortie comportementale ne passe pas par cette modalité, mais par d'autres, comme celle modulée par les neurones MB-V3.

Nous pouvons d'ailleurs noter à ce propos que nous n'avons en réalité pas conclu à l'absence d'implication des MB-V2 dans la MLT appétitive : l'existence de défaut de réponse au sucre nous a interdit d'étudier plus la lignée MB052B, mais rien n'exclut qu'une autre lignée qui n'aurait, elle, pas présenté de défaut de réponse au sucre puisse nous permettre d'impliquer les MB-V2. Enfin, il n'est pas inenvisageable que les MB-V2 soient au cœur d'un circuit d'approche qui serait recruté en cas de rappel de MLT appétitive, mais également en présence de sucre, en dehors de tout apprentissage. Le défaut de sucre serait alors un résultat réel, témoignant de cet aspect motivationnel. Cette hypothèse est au final relativement vraisemblable étant donné que dans Séjourné et al., 2011, la lignée NP2492 marquant tous les MB-V2 présente également un défaut de réponse au sucre.

Néanmoins, il nous faut remarquer que toutes les formes de mémoire ne peuvent dépendre d'une modulation de la réponse innée aux odeurs passant par la CL. C'est le cas des formes de mémoire qui dépendent d'une efférence des lobes γ , comme la MCT appétitive

(Trannoy et al., 2011) ou la MCT aversive (Bouzaiane et al., 2015) puisqu'aucun neurone efférent des lobes γ ne projette sur la CL.

III.3 Projections sur le SMP

Un autre exemple de convergence que l'on peut remarquer est celle des neurones MB-V3 et MB-M6. Tous les deux projettent sur le SMP (ainsi que sur le SIP et SLP pour MB-V3). Ainsi plusieurs formes de mémoire distinctes (MLT appétitive pour les MB-V3, MCT aversive, MT-ARM aversive, LT-ARM aversive et MCT appétitive pour les MB-M6) dépendent de projections sur la même zone. On peut donc suspecter qu'il existe au sein du SMP un nœud important dans la sortie motrice de recherche et d'évitement.

III.4 Combinaisons d'effets comportementaux

Dans ce schéma, la sortie comportementale dérive de la conjonction de plusieurs effets. On peut alors concevoir qu'en altérant un seul à la fois on n'affecte pas suffisamment le comportement de fuite ou d'attraction, masquant dans notre paradigme expérimental l'implication du type neuronal testé. Ceci pourrait alors conduire à de nombreux faux négatifs, et constituerait donc une limite de notre approche.

Dans cette veine, dans l'article dont nous sommes co-auteurs (Aso et al., 2014b), il a été mis en évidence que dans le cas de l'activation par CSChrimson de neurones de valence positive ou négative, la manipulation de combinaison de neurones pouvait avoir un effet plus robuste si l'on combinait des neurones de même valence ou un effet mitigé si l'on combinait des neurones de valence opposées (Figure 113). Cela apporte la preuve que la sortie comportementale est multi-composante et qu'en affecter une seule est de moindre ampleur, et puisse donc passer inaperçu dans certaines circonstances expérimentales.

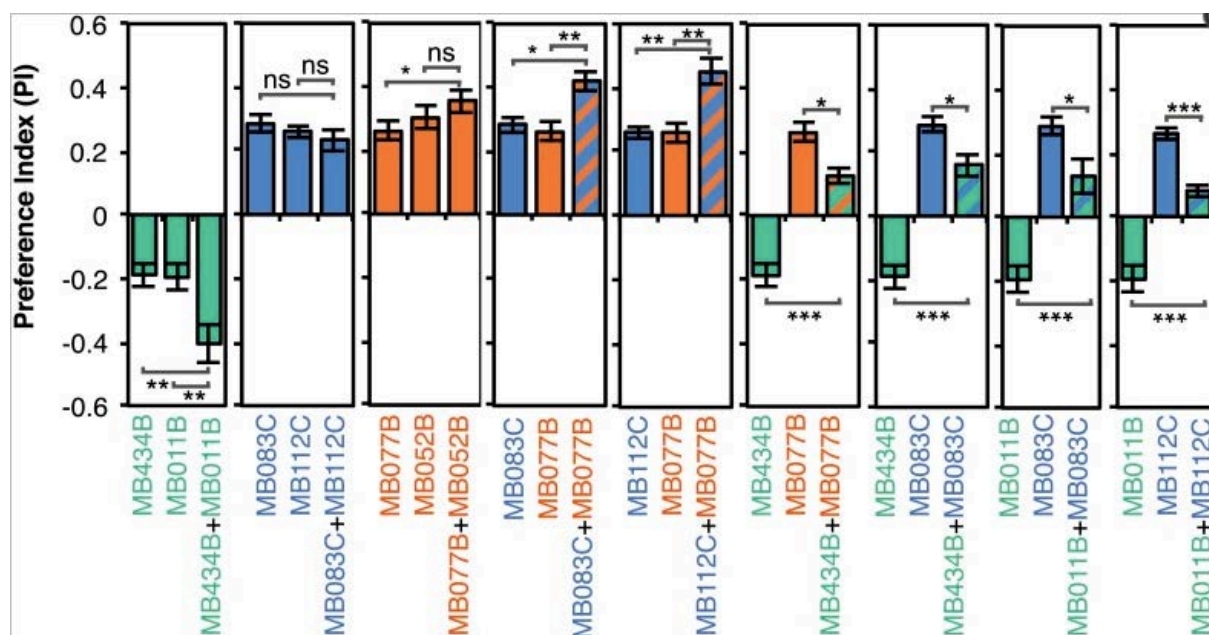


Figure 113 : Effets additifs de l'activité des neurones efférents aux Corps Pédonculés

L'approche par activation de neurones efférents via *CSChrimson* a permis d'identifier la valence portée par ceux-ci. Ici, les auteurs démontrent que certaines combinaisons de types neuronaux permettent un effet additif de valences négatives (premier encart), un effet additif de valences positives (encarts 3,4 et 5) ou un effet additif de valences opposées, menant à un effet mitigé (encarts 6, 7, 8 et 9) (Aso et al, 2014b).

Nous pouvons donc envisager que chacune des formes de mémoire dépende de ces différentes modalités motrices, et que nous n'avons en réalité pas identifié tous les neurones efférents impliqués, pour la seule raison que les blocages individuels ne sont pas suffisants pour observer un effet.

L'approche de l'imagerie *in vivo* permettrait de s'affranchir de ce problème, puisque l'identification d'une trace mnésique dans un neurone suggère fortement son implication, quand bien même son blocage ne serait pas suffisant pour affecter significativement l'expression de la mémoire.

III.5 Existence de différents étages de neurones efférents

Aso et al. ont, dans leur travail de caractérisation des neurones efférents, identifié des neurones efférents ayant la particularité de projeter sur d'autres zones des CP eux-mêmes. La découverte de ces neurones nous conduit à plusieurs réflexions.

Tout d'abord, l'existence de neurones efférents projetant des lobes γ vers les lobes α/β (MBON γ 1ped α/β , ou neurones MVP2) résonne avec le fait que la mémoire à court terme réside dans les lobes γ , tandis que les MLT aversive réside, elle, dans les lobes α/β . Cela ouvre la possibilité que ces neurones participent à un transfert du stockage de l'information mnésique des lobes γ aux lobes α/β durant la consolidation (dans le cas de la mémoire appétitive, cette hypothèse est moins plausible dans la mesure où la MCT et la MLT appétitives sont formées en parallèle et de manière indépendante (Trannoy et al., 2011)). On pourrait interpréter ce mécanisme comme une consolidation systémique avec un transfert de l'information encodée des KC γ vers les KC α/β , de façon analogue à ce que l'on observe pour certaines mémoires épisodiques chez les mammifères, avec une mémoire d'abord formée au niveau de l'hippocampe puis progressivement transférée au niveau cortical.

Cette architecture permet d'imaginer qu'une telle consolidation systémique dépende d'un phénomène de « replay » pendant la phase de consolidation mnésique, de façon également analogue au « replay » qui a lieu chez les mammifères pendant le sommeil (de Lavilléon et al., 2015).

IV. Identification de neurones en aval des MB-V2 nécessaires au rappel des mémoires aversives

IV.1 Le *Cluster 11* serait nécessaire au rappel de tous les types de mémoire requérant les MB-V2

Identifier et caractériser des neurones en aval des neurones de sortie des CP était la suite logique de la première partie de ma thèse, qui a relevé de l'étude de ces neurones efférents eux-mêmes. Il s'agissait de commencer à déchiffrer le réseau neuronal du rappel de la mémoire au niveau suivant. Décrire plus avant le réseau peut avoir deux conséquences intéressantes : d'une part, mieux comprendre comment émergent les conséquences comportementales (ou « modalités » comme je l'écrivais plus haut) de l'activation des neurones de sortie (par exemple, attraction pour les neurones MB-V2, répulsion pour les neurones MB-M6) ; d'autre part, éventuellement découvrir à quel stade les circuits de rappel des différentes formes de mémoire convergent de nouveau, et comprendre pourquoi celles-ci nécessitent à un certain stade d'être traitées différemment.

Notre attention s'est portée sur les neurones en aval des neurones MB-V2 α , neurones efférents majeurs du rappel de la mémoire aversive, puisqu'impliqués dans la remobilisation de la ST-ARM, de la MMT et de la MLT (Séjourné et al., 2011, Bouzaiane et al., 2015). Il est donc nécessaire qu'au moins un des neurones en aval conduise à son tour l'information destinée à produire le comportement conditionné.

En ce sens, l'équipe de Gregory Jefferis ayant a priori ciblé tous les neurones potentiellement post-synaptiques aux neurones MB-V2 α , nous avons de bonnes chances d'identifier parmi eux les neurones responsables du rappel, grâce aux lignées ciblant les trois *clusters* candidats. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la possibilité que plusieurs *clusters* à la fois se chargent de la transmission de l'information, et, auquel cas, que le blocage de l'un d'entre eux seulement ne soit pas suffisant.

Nous nous sommes intéressés en premier lieu au rappel de la MMT, et non à celui de la MLT uniquement pour des raisons pratiques. Nous avons pu identifier un ensemble de neurones, le *Cluster 11*, dont le blocage produit un défaut de rappel de MMT (Figure 94). Cela nous indique donc qu'il est essentiel lors de la phase de rappel, mais n'exclut pas non plus l'implication d'autres neurones. On pourrait imaginer que certains des neurones des deux autres *clusters* contribuent également, mais dans une moindre mesure, et que leur blocage ne soit pas suffisant pour induire un défaut de mémoire. Cependant cette hypothèse est peu vraisemblable étant donné que la perte MMT est semblable à celle obtenue lorsque les MB-V2 sont bloqués.

Ayant identifié un *cluster* requis pour le rappel de la MMT, il nous a semblé plausible qu'il soit également impliqué dans le rappel d'autres mémoires dépendantes des neurones MB-V2 α . En effet, il y a une certaine probabilité que les traces mnésiques générées dans les neurones MB-V2 α par les différentes mémoires ne puissent être discriminées par les synapses qu'ils forment avec les neurones en aval. Ainsi les neurones du *Cluster 11* doivent également subir l'influence des traces mnésiques de ST-ARM et MLT, et donc conduire eux même l'information de sortie relative à ces mémoires.

Nous nous sommes donc demandés si les neurones du *Cluster 11* participaient au rappel de la ST-ARM et de la MLT. Au final, il nous est apparu qu'effectivement le *Cluster 11* est essentiel au rappel de la mémoire immédiate (Figure 98). Nous n'avons pas tenté de distinguer par « coldshock » la ST-ARM de la MCT, mais nous sommes certains que c'est la

ST-ARM que nous avons ici adressée, étant donné qu'il est acquis que la ST-ARM et non la MCT dépend des neurones MB-V2 α (Bouzaiane et al., 2015). Et de même, nous avons montré que le rappel de la MLT dépend également des neurones du *Cluster 11* (Figure 97). Une participation des autres *clusters* en aval des neurones MB-V2 α , est, comme pour la MMT, peu probable puisque la perte de MLT liée au blocage du *Cluster 11* est totale, et que la perte de MCT est du même ordre que celle obtenue lors du blocage des MB-V2 α . Tout porte à croire que le *Cluster 11* assure l'intégralité du transfert de l'information ayant transité par les MB-V2 α .

Enfin, même si des expériences d'anatomie sont en cours dans le laboratoire de Gregory Jefferis pour déterminer si d'autres neurones efférents aux CP que les neurones MB-V2 α projettent sur les neurones du *Cluster 11*, l'étude anatomique de Aso et al., 2014 apporte d'ores et déjà des éléments de réponse. D'après la Figure 112, nous pouvons remarquer que seuls les neurones *Output* $\alpha 1$ projettent également au niveau de la CL, donc pourraient être pré-synaptiques aux neurones du *Cluster 11*. Néanmoins, les auteurs ayant également évalué le degré de convergence des neurones efférents entre eux (Figure 114), il est possible de conclure que les neurones *Output* $\alpha 1$ ne projettent vraisemblablement pas sur les neurones du *Cluster 11*, étant donné qu'ils ne présentent aucune convergence avec les MB-V2 α .

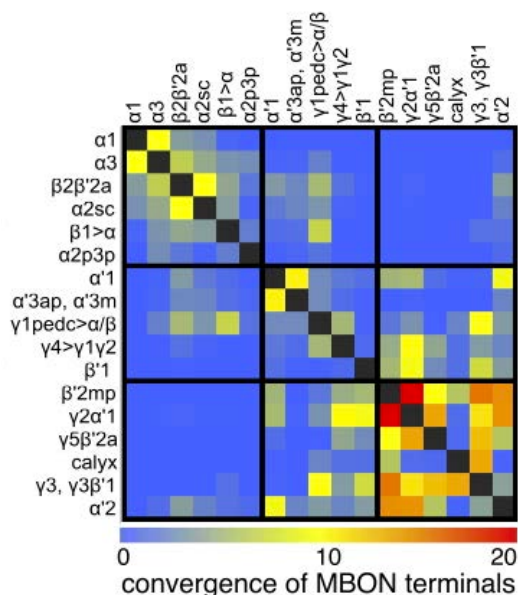


Figure 114 : Caractérisation anatomique des projections axonales des neurones efférents aux CP

Suite à la caractérisation anatomique des projections axonales des neurones efférents aux CP, leur degré de convergence a été établi (Aso et al., 2014).

IV.2 Mise en œuvre de l'étude physiologique de ces neurones

Après avoir identifié des neurones nécessaires au rappel, en aval des neurones MB-V2 qui présentent une trace mnésique, se pose évidemment la question de l'existence du reflet de cette trace dans les neurones du *Cluster 11*.

Nous avons montré que ces neurones répondent aux odeurs chez des drosophiles naïves (Figure 99). L'étape suivante est évidemment de rechercher une modification d'activité dépendante de l'apprentissage dans les neurones marqués dans la lignée 37G11. Si nous la trouvons, cela constituera un argument supplémentaire en faveur de leur rôle dans le rappel mnésique. Les neurones MB-V2 étant cholinergiques, ils sont vraisemblablement excitateurs des neurones en aval. Or il a été montré (Séjourné et al., 2011) que la trace mnésique des MB-V2 consiste en une moindre réponse à l'odeur quand elle a été appariée au stimulus aversif. On attend donc une répercussion dans le même sens sur les neurones du *Cluster 11* : une baisse de la réponse à l'odeur conditionnée.

La mise en évidence de cet éventuel signal mnésique en transit constituerait alors une mesure (*readout*) des processus en jeu dans les CP ou à leur sortie. Par exemple, il sera possible d'adresser le fonctionnement de la synapse KC>neurones MB-V2 en étudiant l'impact de diverses perturbations à ce niveau (via des ARNi spécifiques de gènes candidats exprimés spécifiquement dans les KC ou les neurones MB-V2) sur l'hypothétique signal mnésique du *Cluster 11*.

En outre, dans l'article dont nous sommes co-auteurs (Aso et al., 2014b), comme je l'ai déjà évoqué plus haut, des collaborateurs ont étudié l'effet comportemental de l'activation des neurones MB-V2 via l'effecteur CSChrimson. Ils ont observé que, au même titre que tous les neurones cholinergiques induisant un effet, celle-ci génère une attraction pour le contexte associé à l'activation. Ceci est donc cohérent avec le fait que l'odeur SC+ induise une moindre réponse que l'odeur SC- : l'attraction pour l'odeur qui a été associée au conditionnement est réduite, et relativement à l'autre odeur, il y a répulsion. Au niveau des neurones en aval des neurones MB-V2, cela impliquerait, si la synapse cholinergique est effectivement excitatrice, que la valence des neurones du *Cluster 11* soit similaire aux neurones MB-V2 : la moindre activation de ces neurones en réponse à l'odeur SC+ (en

aversif) est associée à une moindre attraction pour cette odeur. Il serait intéressant d'appliquer la stratégie CSChrimson aux neurones du *Cluster 11* pour vérifier qu'ils induisent également une attraction.

Enfin, pour parachever la compréhension du lien entre MB-V2 et les neurones du *Cluster 11*, nous pourrions tester l'implication des récepteurs cholinergiques en altérant leur expression génétique via des ARNi, tant en comportement qu'en imagerie, ainsi que d'autres acteurs candidats. Plusieurs restrictions sont à soulever : d'une part il existe de nombreuses formes de récepteurs cholinergiques (dépendant notamment de la combinatoire des sous-unités) et d'autre part, les neurones de projection étant également cholinergiques, il conviendrait de vérifier si ceux-ci sont directement pré-synaptiques aux neurones du *Cluster 11* pour savoir si l'on affecterait les deux afférences à la fois.

IV.3 Intégration dans le schéma canonique de réseau neuronal

Nous avons donc pu observer que les neurones du *Cluster 11*, pris dans leur ensemble, répondent aux odeurs Oct et Mch. La question se pose donc de savoir si tous les neurones du *Cluster 11* répondent aux deux odeurs, ou si l'on peut distinguer au sein du cluster des neurones répondant à l'une ou à l'autre. La question qui en découle est de savoir si les MB-V2 viennent moduler un ensemble de neurones « odeur-généralistes » ou si leur effet se manifeste sur des neurones répondant individuellement à différentes odeurs. A ce titre, il serait intéressant de tester si les neurones du *Cluster 11* répondent à d'autres odeurs pouvant faire l'objet d'apprentissage associatif (comme le benzaldéhyde).

De façon plus générale, on aurait pu envisager que les neurones du *Cluster 11* soient des neurones médiant la réponse innée aux odeurs (en tant que neurones de la CL, post-synaptiques aux neurones de projection), et que leur modulation par les MB-V2 relève d'une modulation de la réponse innée. Ce n'est cependant pas le cas, puisque leur blocage ne produit pas de défaut d'olfaction.

Il faut donc concevoir que les neurones du *Cluster 11* sont des neurones qui conduisent l'information mnésique pour moduler le comportement, sans pour autant jouer de rôle dans la réponse innée. Il est donc probable que la convergence avec les autres neurones de la CL impliqués, eux, dans la réponse innée aux odeurs se produise encore en aval, dans la ou les zone(s) de projection des neurones du *Cluster 11*. D'après l'anatomie des neurones du *Cluster 11*, tels qu'on les voit dans la lignée 37G11, il s'agirait du SMP, une zone justement

ciblée par d'autres neurones efférents aux CP, et à même de participer à l'exécution des commandes motrices (Aso et al., 2014b). Une possibilité intéressante est que les neurones du *Cluster II* contactent alors, au sein du SMP, des neurones du Complexe Central, une région coordonnant les patrons moteurs (Strauss, 2002).

Conclusion générale

Mes travaux de thèse se sont focalisés sur la phase de rappel de la MLT aversive et de la MLT appétitive. Le premier axe que j'ai suivi a consisté en l'étude des neurones requis pour la phase de rappel, par une approche comportementale d'identification systématique des différentes sous-populations de KC, de neurones afférents aux CP et de neurones efférents aux CP requises, en s'appuyant sur un blocage thermogénétique de la neurotransmission des neurones ciblés.

Par rapport à l'objectif d'identification exhaustive des neurones impliqués dans le rappel, nous avons pu confirmer des implications de neurones déjà documentées pour la MLT aversive, avec les KC α/β (de sous-types *surface* et *postérieur*) et le *cluster* MB-V2, et pour la MLT appétitive, avec les KC α/β (avec au minimum un rôle essentiel du sous-type *cœur*) et les neurones MB-V3. Ces confirmations constituent en elles-mêmes un succès majeur de ce projet, permettant d'asseoir encore un peu plus ces résultats. En outre, au regard de mes données, nous pensons probable que nous soyons arrivés au terme de l'identification des neurones efférents impliqués dans le rappel des MLT olfactives aversives et appétitives. Mon travail met ainsi en exergue le fait que les circuits du rappel de la MLT sont fondamentalement différents, selon qu'il s'agit de l'avérisif ou de l'appétitif. Les mémoires aversives et appétitives ne sont donc pas de simples réciproques l'une de l'autre, et les mécanismes qui les régissent leur sont, au moins partiellement, spécifiques. Enfin, ces résultats rendent compte d'une convergence extrême depuis les KC vers les neurones efférents

Ma thèse s'est aussi articulée autour d'un second axe, dans la continuité du premier, visant à l'identification de neurones de la CL, en aval des neurones efférents MB-V2, qui seraient nécessaires au rappel de plusieurs formes de mémoire aversive dépendant de ces neurones MB-V2. J'ai pu impliquer, grâce aux expériences comportementales, un ensemble de neurones, le *Cluster II*, essentiel au rappel de la MLT, de la MMT et de la ST-ARM. Ce résultat souligne notamment que toutes les formes de mémoire dépendant des neurones MB-V2 continuent en aval à emprunter une « voie de sortie » commune.

Des expériences préliminaires d'imagerie calcique *in vivo* montrent que les neurones du *Cluster II* répondent à la présentation de molécules odorantes, de façon cohérente avec le rôle de relai olfactif de la CL. Des expériences à venir permettront de caractériser les

modifications de ces réponses induites par le conditionnement. Afin de pouvoir interpréter l'effet de ces modifications éventuelles, il faudra également déterminer avec précision quelles zones sont ciblées par les neurones du *Cluster 11* afin de poursuivre la compréhension de la réponse comportementale apprise, dans le cadre de la MLT, de la MMT et de la ST-ARM.

En appliquant la même démarche aux formes de mémoire dépendant des neurones efférents MB-M6, il sera possible de comprendre où se fait la convergence avec la voie *MB-V2-Cluster 11*, et, dans une perspective plus large, pourquoi ces deux voies mnésiques nécessitent un traitement indépendant en terme de réseau efférent. La compréhension fine des circuits aidera à déterminer ce qui, mécaniquement, distingue fondamentalement les mémoires dépendant des neurones MB-V2 de celles dépendant des neurones MB-M6.

Enfin, grâce à la mise en œuvre de travaux similaires pour toutes les étapes des différentes formes de mémoire, nous allons vraisemblablement assister, dans les prochaines années, à l'émergence d'une vision synthétique de la mémoire associative olfactive de la drosophile en terme de réseaux et de mécanismes fondamentaux. La description complète des formes de mémoire qui co-existent et sont traitées de manière parallèle, alliée à la compréhension fine de leurs mécanismes sous-jacents, pourraient offrir des pistes pour l'identification de schémas similaires chez d'autres espèces.

Bibliographie

Aceves-Piña, E.O., Booker, R., Duerr, J.S., Livingstone, M.S., Quinn, W.G., Smith, R.F., Sziber, P.P., Tempel, B.L., Tully, T.P., 1983. Learning and memory in *Drosophila*, studied with mutants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48 Pt 2, 831–840.

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.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Miklos, 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., Pablos, B. de, 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.C., 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., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.-Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.-F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195. doi:10.1126/science.287.5461.2185

Akalal, D.-B.G., Yu, D., Davis, R.L., 2011. The Long-Term Memory Trace Formed in the *Drosophila* α/β Mushroom Body Neurons Is Abolished in Long-Term Memory Mutants. *J. Neurosci.* 31, 5643–5647. doi:10.1523/JNEUROSCI.3190-10.2011

Amrein, H., Thorne, N., 2005. Gustatory Perception and Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, R673–R684. doi:10.1016/j.cub.2005.08.021

Arendt, D., Nubler-Jung, K., 1999. Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* 126, 2309–2325.

Aso, Y., Grübel, K., Busch, S., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Tanimoto, H., 2009. The Mushroom Body of Adult *Drosophila* Characterized by GAL4 Drivers. *J. Neurogenet.* 23, 156–172. doi:10.1080/01677060802471718

Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R.M., Iyer, N.A., Ngo, T.-T., Dionne, H., Abbott, L.F., Axel, R., Tanimoto, H., Rubin, G.M., 2014a. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* 3, e04577.

Bibliographie

doi:10.7554/eLife.04577

Aso, Y., Herb, A., Ogueta, M., Siwanowicz, I., Templier, T., Friedrich, A.B., Ito, K., Scholz, H., Tanimoto, H., 2012. Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLoS Genet.* 8, e1002768. doi:10.1371/journal.pgen.1002768

Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K.R., Vogt, K., Belliard-Guérin, G., Plaçais, P.-Y., Robie, A.A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., Rowell, W.J., Johnston, R.M., Ngo, T.-T.B., Chen, N., Korff, W., Nitabach, M.N., Heberlein, U., Preat, T., Branson, K.M., Tanimoto, H., Rubin, G.M., 2014b. Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife* 3, e04580. doi:10.7554/eLife.04580

Aso, Y., Siwanowicz, I., Bräcker, L., Ito, K., Kitamoto, T., Tanimoto, H., 2010. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Curr. Biol. CB* 20, 1445–1451. doi:10.1016/j.cub.2010.06.048

Awasaki, T., Lee, T., 2011. New tools for the analysis of glial cell biology in *Drosophila*. *Glia* 59, 1377–1386. doi:10.1002/glia.21133

Baddeley, A., 2003. Working memory: looking back and looking forward. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 829–839. doi:10.1038/nrn1201

Banerjee, S., Bhat, M.A., 2008. Glial ensheathment of peripheral axons in *Drosophila*. *J. Neurosci. Res.* 86, 1189–1198. doi:10.1002/jnr.21574

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300.

Benton, R., 2008. Chemical sensing in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol., Sensory systems* 18, 357–363. doi:10.1016/j.conb.2008.08.012

Benton, R., Sachse, S., Michnick, S.W., Vosshall, L.B., 2006. Atypical Membrane Topology and Heteromeric Function of *Drosophila* Odorant Receptors In Vivo. *PLoS Biol.* 4. doi:10.1371/journal.pbio.0040020

Benton, R., Vannice, K.S., Gomez-Diaz, C., Vosshall, L.B., 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136, 149–162. doi:10.1016/j.cell.2008.12.001

Bicker, G., 1998. NO news from insect brains. *Trends Neurosci.* 21, 349–355. doi:10.1016/S0166-2236(98)01236-3

Binder, J.R., Desai, R.H., 2011. The neurobiology of semantic memory. *Trends Cogn. Sci.* 15, 527–536. doi:10.1016/j.tics.2011.10.001

Blum, A.L., Li, W., Cressy, M., Dubnau, J., 2009. Short- and Long-Term Memory in *Drosophila* Require cAMP Signaling in Distinct Neuron Types. *Curr. Biol.* 19, 1341–1350. doi:10.1016/j.cub.2009.07.016

Boekhoff-Falk, G., 2005. Hearing in *Drosophila*: development of Johnston's organ and emerging parallels to vertebrate ear development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 232, 550–558. doi:10.1002/dvdy.20207

Bibliographie

- Bouzaiane, E., Trannoy, S., Scheunemann, L., Plaçais, P.-Y., Preat, T., 2015. Two Independent Mushroom Body Output Circuits Retrieve the Six Discrete Components of *Drosophila* Aversive Memory. *Cell Rep.* 11, 1280–1292. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.044
- Boynton, S., Tully, T., 1992. *latheo*, a new gene involved in associative learning and memory in *Drosophila melanogaster*, identified from P element mutagenesis. *Genetics* 131, 655–672.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brembs, B., 2008. Operant Learning of *Drosophila* at the Torque Meter. *J. Vis. Exp. JoVE.* doi:10.3791/731
- Brooks, E.S., Greer, C.L., Romero-Calderón, R., Serway, C.N., Grygoruk, A., Haimovitz, J.M., Nguyen, B.T., Najibi, R., Tabone, C.J., de Belle, J.S., Krantz, D.E., 2011. A putative vesicular transporter expressed in *Drosophila* mushroom bodies that mediates sexual behavior may define a neurotransmitter system. *Neuron* 72, 316–329. doi:10.1016/j.neuron.2011.08.032
- Burke, C.J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M.J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., Waddell, S., 2012. Layered reward signaling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* 492, 433–437. doi:10.1038/nature11614
- Burke, C.J., Waddell, S., 2011. Remembering Nutrient Quality of Sugar in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 21, 746–750. doi:10.1016/j.cub.2011.03.032
- Bushey, D., Cirelli, C., 2011. From genetics to structure to function: Exploring sleep in *Drosophila*. *Int. Rev. Neurobiol.* 99, 213–244. doi:10.1016/B978-0-12-387003-2.00009-4
- Cao, G., Platasa, J., Pieribone, V.A., Raccuglia, D., Kunst, M., Nitabach, M.N., 2013. Genetically Targeted Optical Electrophysiology in Intact Neural Circuits. *Cell* 154, 904–913. doi:10.1016/j.cell.2013.07.027
- Caron, S.J.C., Ruta, V., Abbott, L.F., Axel, R., 2013. Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* 497, 113–117. doi:10.1038/nature12063
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Cervantes-Sandoval, I., Martin-Peña, A., Berry, J.A., Davis, R.L., 2013. System-Like Consolidation of Olfactory Memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 33, 9846–9854. doi:10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013
- Chabaud, M.-A., Devaud, J.-M., Pham-Delègue, M.-H., Preat, T., Kaiser, L., 2006. Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* 192, 1335–1348. doi:10.1007/s00359-006-0160-3
- Chen, C.-C., Wu, J.-K., Lin, H.-W., Pai, T.-P., Fu, T.-F., Wu, C.-L., Tully, T., Chiang, A.-S., 2012. Visualizing Long-Term Memory Formation in Two Neurons of the *Drosophila* Brain. *Science* 335, 678–685. doi:10.1126/science.1212735
- Chen, C.N., Denome, S., Davis, R.L., 1986. Molecular analysis of cDNA clones and

Bibliographie

the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce+* gene, the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 9313–9317.

Colomb, J., Kaiser, L., Chabaud, M.-A., Preat, T., 2009. Parametric and genetic analysis of *Drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. *Genes Brain Behav.* 8, 407–415. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00482.x

Comas, D., Petit, F., Preat, T., 2004. *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430, 460–463. doi:10.1038/nature02726

Couto, A., Alenius, M., Dickson, B.J., 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol. CB* 15, 1535–1547. doi:10.1016/j.cub.2005.07.034

Crittenden, J.R., Skoulakis, E.M.C., Han, K.-A., Kalderon, D., Davis, R.L., 1998. Tripartite Mushroom Body Architecture Revealed by Antigenic Markers. *Learn. Mem.* 5, 38–51. doi:10.1101/lm.5.1.38

Dahanukar, A., Ray, A., 2011. Courtship, aggression and avoidance: pheromones, receptors and neurons for social behaviors in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 5, 58–63.

Davis, R.L., 2011. Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70, 8–19. doi:10.1016/j.neuron.2011.03.012

De Belle, J.S., Heisenberg, M., 1994. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263, 692–695.

De Lavilléon, G., Lacroix, M.M., Rondi-Reig, L., Benchenane, K., 2015. Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nat. Neurosci.* 18, 493–495. doi:10.1038/nn.3970

Didelot, G., Molinari, F., Tchénio, P., Comas, D., Milhiet, E., Munnich, A., Colleaux, L., Preat, T., 2006. Tequila, a Neurotrypsin Ortholog, Regulates Long-Term Memory Formation in *Drosophila*. *Science* 313, 851–853. doi:10.1126/science.1127215

Dubnau, J., Chiang, A.-S., 2013. Systems memory consolidation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol., Neurogenetics* 23, 84–91. doi:10.1016/j.conb.2012.09.006

Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., Tully, T., 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, 476–480. doi:10.1038/35078077

Dudai, Y., Jan, Y.N., Byers, D., Quinn, W.G., Benzer, S., 1976. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1684–1688.

Dunipace, L., Meister, S., McNealy, C., Amrein, H., 2001. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Curr. Biol.* 11, 822–835. doi:10.1016/S0960-9822(01)00258-5

Dupuis, J., Louis, T., Gauthier, M., Raymond, V., 2012. Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: From genes to behavioral functions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1553–1564. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.04.003

Bibliographie

Dura, J.M., Preat, T., Tully, T., 1993. Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* 9, 1–14.

Elmore, T., Ignell, R., Carlson, J.R., Smith, D.P., 2003. Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9906–9912.

Ferbinteanu, J., Kennedy, P.J., Shapiro, M.L., 2006. Episodic memory--from brain to mind. *Hippocampus* 16, 691–703. doi:10.1002/hipo.20204

Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J.-M., Buchner, E., Galizia, C.G., 2002. Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons. *Curr. Biol. CB* 12, 1877–1884.

Fishilevich, E., Vosshall, L.B., 2005. Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr. Biol. CB* 15, 1548–1553. doi:10.1016/j.cub.2005.07.066

Folkers, E., Drain, P., Quinn, W.G., 1993. Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8123–8127.

Folkers, E., Waddell, S., Quinn, W.G., 2006. The *Drosophila* radish gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17496–17500. doi:10.1073/pnas.0608377103

Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J.-A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M.-P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulo, D., Perez, F., Plessis, A., Rossé, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., Daviet, L., 2005. Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. *Genome Res.* 15, 376–384. doi:10.1101/gr.2659105

Freeman, M.R., 2015. *Drosophila* Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a020552. doi:10.1101/cshperspect.a020552

Freeman, M.R., Doherty, J., 2006. Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci.* 29, 82–90. doi:10.1016/j.tins.2005.12.002

Gasbarri, A., Pompili, A., Packard, M.G., Tomaz, C., 2014. Habit learning and memory in mammals: Behavioral and neural characteristics. *Neurobiol. Learn. Mem.* 114, 198–208. doi:10.1016/j.nlm.2014.06.010

Géminard, C., Rulifson, E.J., Léopold, P., 2009. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metab.* 10, 199–207. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.002

Gervasi, N., Tchénio, P., Preat, T., 2010. PKA Dynamics in a *Drosophila* Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by Dunce Phosphodiesterase. *Neuron* 65, 516–529. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.014

Goldman-Rakic, P.S., 1992. Working memory and the mind. *Sci. Am.* 267, 110–117.

Hallem, E.A., Ho, M.G., Carlson, J.R., 2004. The molecular basis of odor coding in

Bibliographie

the *Drosophila* antenna. *Cell* 117, 965–979. doi:10.1016/j.cell.2004.05.012

Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J., Garrity, P.A., 2008. An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454, 217–220. doi:10.1038/nature07001

Hannan, F., Hall, L.M., 1993. Muscarinic acetylcholine receptors in invertebrates: comparisons with homologous receptors from vertebrates. *EXS* 63, 98–145.

Haynes, P.R., Christmann, B.L., Griffith, L.C., 2015. A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife* e03868. doi:10.7554/eLife.03868

Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Keller, A., Stocker, R.F., 2001. A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15336–15341. doi:10.1073/pnas.011314898

Heisenberg, M., 2003. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 266–275. doi:10.1038/nrn1074

Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., Byers, D., 1985. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* 2, 1–30.

Helfrich-Förster, C., 2004. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J. Comp. Physiol. A* 190, 601–613. doi:10.1007/s00359-004-0527-2

Hen, R., 1993. Structural and functional conservation of serotonin receptors throughout evolution. *EXS* 63, 266–278.

Herry, C., Johansen, J.P., 2014. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 1644–1654. doi:10.1038/nn.3869

Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., Saitoe, M., 2013. Fasting Launches CRTC to Facilitate Long-Term Memory Formation in *Drosophila*. *Science* 339, 443–446. doi:10.1126/science.1227170

Huang, C., Wang, P., Xie, Z., Wang, L., Zhong, Y., 2013. The differential requirement of mushroom body α/β subdivisions in long-term memory retrieval in *Drosophila*. *Protein Cell* 4, 512–519. doi:10.1007/s13238-013-3035-8

Isabel, G., Pascual, A., Preat, T., 2004. Exclusive Consolidated Memory Phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024–1027. doi:10.1126/science.1094932

Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D., 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761–771.

Ito, K., Suzuki, K., Estes, P., Ramaswami, M., Yamamoto, D., Strausfeld, N.J., 1998. The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 5, 52–77.

Jayaraman, V., Laurent, G., 2007. Evaluating a Genetically Encoded Optical Sensor of

Bibliographie

Neural Activity Using Electrophysiology in Intact Adult Fruit Flies. *Front. Neural Circuits* 1. doi:10.3389/neuro.04.003.2007

Jefferis, G.S., Marin, E.C., Stocker, R.F., Luo, L., 2001. Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414, 204–208. doi:10.1038/35102574

Jefferis, G.S.X.E., Potter, C.J., Chan, A.M., Marin, E.C., Rohlfsing, T., Maurer, C.R., Luo, L., 2007. Comprehensive Maps of *Drosophila* Higher Olfactory Centers: Spatially Segregated Fruit and Pheromone Representation. *Cell* 128, 1187–1203. doi:10.1016/j.cell.2007.01.040

Jin, L., Han, Z., Platasa, J., Wooltorton, J.R.A., Cohen, L.B., Pieribone, V.A., 2012. Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron* 75, 779–785. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.040

Johard, H.A.D., Enell, L.E., Gustafsson, E., Trifilieff, P., Veenstra, J.A., Nässel, D.R., 2008. Intrinsic neurons of *Drosophila* mushroom bodies express short neuropeptide F: relations to extrinsic neurons expressing different neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 507, 1479–1496. doi:10.1002/cne.21636

Kamikouchi, A., Inagaki, H.K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Göpfert, M.C., Ito, K., 2009. The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature* 458, 165–171. doi:10.1038/nature07810

Keene, A.C., Krashes, M.J., Leung, B., Bernard, J.A., Waddell, S., 2006. *Drosophila* Dorsal Paired Medial Neurons Provide a General Mechanism for Memory Consolidation. *Curr. Biol.* 16, 1524–1530. doi:10.1016/j.cub.2006.06.022

Kim, S.K., Rulifson, E.J., 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. *Nature* 431, 316–320. doi:10.1038/nature02897

Kim, Y.-C., Lee, H.-G., Han, K.-A., 2007. Classical reward conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Genes Brain Behav.* 6, 201–207. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00241.x

Kim, Y.-C., Lee, H.-G., Lim, J., Han, K.-A., 2013. Appetitive Learning Requires the Alpha1-Like Octopamine Receptor OAMB in the *Drosophila* Mushroom Body Neurons. *J. Neurosci.* 33, 1672–1677. doi:10.1523/JNEUROSCI.3042-12.2013

Kitamoto, T., 2002. Targeted expression of temperature-sensitive dynamin to study neural mechanisms of complex behavior in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* 16, 205–228.

Kitamoto, T., 2001. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* 47, 81–92. doi:10.1002/neu.1018

Krashes, M.J., Waddell, S., 2008. Rapid Consolidation to a radish and Protein Synthesis-Dependent Long-Term Memory after Single-Session Appetitive Olfactory Conditioning in *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3103–3113. doi:10.1523/JNEUROSCI.5333-07.2008

Laissue, P.P., Reiter, C., Hiesinger, P.R., Halter, S., Fischbach, K.F., Stocker, R.F.,

Bibliographie

1999. Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 405, 543–552.

Langley, A.R., Smith, J.C., Stemple, D.L., Harvey, S.A., 2014. New insights into the maternal to zygotic transition. *Development* 141, 3834–3841. doi:10.1242/dev.102368

Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., Vosshall, L.B., 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703–714. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.019

Lazarus, L.H., Wilson, W.E., Gaudino, G., Irons, B.J., Guglietta, A., 1985. Evolutionary relationship between nonmammalian and mammalian peptides. *Peptides* 6 Suppl 3, 295–307.

Lee, G., Park, J.H., 2004. Hemolymph Sugar Homeostasis and Starvation-Induced Hyperactivity Affected by Genetic Manipulations of the Adipokinetic Hormone-Encoding Gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311–323. doi:10.1534/genetics.167.1.311

Lee, P.-T., Lin, H.-W., Chang, Y.-H., Fu, T.-F., Dubnau, J., Hirsh, J., Lee, T., Chiang, A.-S., 2011. Serotonin–mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13794–13799. doi:10.1073/pnas.1019483108

Lei, Z., Chen, K., Li, H., Liu, H., Guo, A., 2013. The GABA system regulates the sparse coding of odors in the mushroom bodies of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 35–40. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.036

Leopold, P., Perrimon, N., 2007. *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature* 450, 186–188. doi:10.1038/nature06286

Lin, A.C., Bygrave, A., de Calignon, A., Lee, T., Miesenböck, G., 2014. Sparse, Decorrelated Odor Coding in the Mushroom Body Enhances Learned Odor Discrimination. *Nat. Neurosci.* 17, 559–568. doi:10.1038/nn.3660

Lin, H.-H., Lai, J.S.-Y., Chin, A.-L., Chen, Y.-C., Chiang, A.-S., 2007. A map of olfactory representation in the *Drosophila* mushroom body. *Cell* 128, 1205–1217. doi:10.1016/j.cell.2007.03.006

Lin, S.-C., Chang, Y.-Y., Chan, C.-C., 2014. Strategies for gene disruption in *Drosophila*. *Cell Biosci.* 4. doi:10.1186/2045-3701-4-63

Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B.D., Aso, Y., Friedrich, A.B., Siwanowicz, I., Rubin, G.M., Preat, T., Tanimoto, H., 2012. A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* 488, 512–516. doi:10.1038/nature11304

Liu, L., Wolf, R., Ernst, R., Heisenberg, M., 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* 400, 753–756. doi:10.1038/23456

Liu, X., Davis, R.L., 2009. The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nat. Neurosci.* 12, 53–59. doi:10.1038/nn.2235

Livingstone, M.S., Sziber, P.P., Quinn, W.G., 1984. Loss of calcium/calmodulin

Bibliographie

responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37, 205–215. doi:10.1016/0092-8674(84)90316-7

Luan, H., Peabody, N.C., Vinson, C.R., White, B.H., 2006. Refined Spatial Manipulation of Neuronal Function by Combinatorial Restriction of Transgene Expression. *Neuron* 52, 425–436. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.028

Mao, Z., Davis, R.L., 2009. Eight Different Types of Dopaminergic Neurons Innervate the *Drosophila* Mushroom Body Neuropil: Anatomical and Physiological Heterogeneity. *Front. Neural Circuits* 3. doi:10.3389/neuro.04.005.2009

Marin, E.C., Jefferis, G.S.X.E., Komiyama, T., Zhu, H., Luo, L., 2002. Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109, 243–255.

Martin, J.R., Ernst, R., Heisenberg, M., 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 5, 179–191.

Martin, J.R., Raabe, T., Heisenberg, M., 1999. Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 185, 277–288.

Mast, F.W., Preuss, N., Hartmann, M., Grabherr, L., 2014. Spatial cognition, body representation and affective processes: the role of vestibular information beyond ocular reflexes and control of posture. *Front. Integr. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnint.2014.00044

McBride, S.M., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., Siwicki, K.K., 1999. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24, 967–977.

McGuire, S.E., Le, P.T., Davis, R.L., 2001. The Role of *Drosophila* Mushroom Body Signaling in Olfactory Memory. *Science* 293, 1330–1333. doi:10.1126/science.1062622

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., Davis, R.L., 2003. Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765–1768. doi:10.1126/science.1089035

Mehren, J.E., Ejima, A., Griffith, L.C., 2004. Unconventional sex: fresh approaches to courtship learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 745–750. doi:10.1016/j.conb.2004.10.012

Miesenböck, G., De Angelis, D.A., Rothman, J.E., 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192–195. doi:10.1038/28190

Montell, C., 2005. TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J. Physiol.* 567, 45–51. doi:10.1113/jphysiol.2005.092551

Murthy, M., Fiete, I., Laurent, G., 2008. Testing Odor Response Stereotypy in the *Drosophila* Mushroom Body. *Neuron* 59, 1009–1023. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.040

Musso, P.-Y., Tchenio, P., Preat, T., 2015. Delayed Dopamine Signaling of Energy Level Builds Appetitive Long-Term Memory in *Drosophila*. *Cell Rep.* 10, 1023–1031. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.036

Muthukumar, A.K., Stork, T., Freeman, M.R., 2014. Activity-dependent regulation of

Bibliographie

astrocyte GAT levels during synaptogenesis. *Nat. Neurosci.* 17, 1340–1350. doi:10.1038/nn.3791

Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K., 2001. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137–141. doi:10.1038/84397

O’Kane, C.J., Gehring, W.J., 1987. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 9123–9127.

Pai, T.-P., Chen, C.-C., Lin, H.-H., Chin, A.-L., Lai, J.S.-Y., Lee, P.-T., Tully, T., Chiang, A.-S., 2013. *Drosophila* ORB protein in two mushroom body output neurons is necessary for long-term memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7898–7903. doi:10.1073/pnas.1216336110

Perisse, E., Yin, Y., Lin, A.C., Lin, S., Huetteroth, W., Waddell, S., 2013. Different Kenyon Cell Populations Drive Learned Approach and Avoidance in *Drosophila*. *Neuron* 79, 945–956. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.045

Peschel, N., Helfrich-Förster, C., 2011. Setting the clock – by nature: Circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett., Circadian Rhythms* 585, 1435–1442. doi:10.1016/j.febslet.2011.02.028

Pfeiffer, B.D., Jenett, A., Hammonds, A.S., Ngo, T.-T.B., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J.W., Wan, K.H., Laverty, T.R., Mungall, C., Svirskas, R., Kadonaga, J.T., Doe, C.Q., Eisen, M.B., Celniker, S.E., Rubin, G.M., 2008. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9715–9720. doi:10.1073/pnas.0803697105

Pfeiffer, B.D., Ngo, T.-T.B., Hibbard, K.L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J.W., Rubin, G.M., 2010. Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *Genetics* 186, 735–755. doi:10.1534/genetics.110.119917

Pfeiffer, B.D., Truman, J.W., Rubin, G.M., 2012. Using translational enhancers to increase transgene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6626–6631. doi:10.1073/pnas.1204520109

Pitman, J.L., DasGupta, S., Krashes, M.J., Leung, B., Perrat, P.N., Waddell, S., 2009. There are many ways to train a Fly (*Austin*) 3, 3.

Pitman, J.L., Huetteroth, W., Burke, C.J., Krashes, M.J., Lai, S.-L., Lee, T., Waddell, S., 2011. A Pair of Inhibitory Neurons Are Required to Sustain Labile Memory in the *Drosophila* Mushroom Body. *Curr. Biol.* 21, 855–861. doi:10.1016/j.cub.2011.03.069

Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P., Allada, R., 2006. A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* 441, 753–756. doi:10.1038/nature04739

Plaçais, P.-Y., Preat, T., 2013. To Favor Survival Under Food Shortage, the Brain Disables Costly Memory. *Science* 339, 440–442. doi:10.1126/science.1226018

Plaçais, P.-Y., Trannoy, S., Friedrich, A.B., Tanimoto, H., Preat, T., 2013. Two Pairs of Mushroom Body Efferent Neurons Are Required for Appetitive Long-Term Memory Retrieval in *Drosophila*. *Cell Rep.* 5, 769–780. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.032

Bibliographie

- Plaçais, P.-Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliard-Guérin, G., Vernier, P., Birman, S., Tanimoto, H., Preat, T., 2012. Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 15, 592–599. doi:10.1038/nn.3055
- Quinn, W.G., Harris, W.A., Benzer, S., 1974. Conditioned Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 708–712.
- Quinn, W.G., Sziber, P.P., Booker, R., 1979. The *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Nature* 277, 212–214.
- Rahn, E.J., Guzman-Karlsson, M.C., Sweatt, J.D., 2013. CELLULAR, MOLECULAR, AND EPIGENETIC MECHANISMS IN NON-ASSOCIATIVE CONDITIONING: IMPLICATIONS FOR PAIN AND MEMORY. *Neurobiol. Learn. Mem.* 105, 133–150. doi:10.1016/j.nlm.2013.06.008
- Riemensperger, T., Pech, U., Dipt, S., Fiala, A., 2012. Optical calcium imaging in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., Biochemical, biophysical and genetic approaches to intracellular calcium signalling* 1820, 1169–1178. doi:10.1016/j.bbagen.2012.02.013
- Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A., Garrity, P.A., 2005. The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev.* 19, 419–424. doi:10.1101/gad.1278205
- Rubin, G.M., 2000. Biological annotation of the *Drosophila* genome sequence. *Novartis Found. Symp.* 229, 79–82; discussion 82–83.
- Saper, C.B., Chou, T.C., Elmquist, J.K., 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36, 199–211.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., Touhara, K., 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002–1006. doi:10.1038/nature06850
- Scheunemann, L., Jost, E., Richlitzki, A., Day, J.P., Sebastian, S., Thum, A.S., Efetova, M., Davies, S.-A., Schwärzel, M., 2012. Consolidated and Labile Odor Memory Are Separately Encoded within the *Drosophila* Brain. *J. Neurosci.* 32, 17163–17171. doi:10.1523/JNEUROSCI.3286-12.2012
- Scheunemann, L., Skroblin, P., Hundsruker, C., Klussmann, E., Efetova, M., Schwärzel, M., 2013. AKAPS Act in a Two-Step Mechanism of Memory Acquisition. *J. Neurosci.* 33, 17422–17428. doi:10.1523/JNEUROSCI.1303-13.2013
- Schwaerzel, M., Heisenberg, M., Zars, T., 2002. Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35, 951–960.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M., 2003. Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 23, 10495–10502.
- Scott, K., Brady Jr., R., Cravchik, A., Morozov, P., Rzhetsky, A., Zuker, C., Axel, R., 2001. A Chemosensory Gene Family Encoding Candidate Gustatory and Olfactory Receptors in *Drosophila*. *Cell* 104, 661–673. doi:10.1016/S0092-8674(01)00263-X

Bibliographie

- 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., Preat, T., 2011. Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 14, 903–910. doi:10.1038/nn.2846
- Siegel, R.W., Hall, J.C., 1979. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3430–3434.
- Silbering, A.F., Rytz, R., Grosjean, Y., Abuin, L., Ramdya, P., Jefferis, G.S.X.E., Benton, R., 2011. Complementary Function and Integrated Wiring of the Evolutionarily Distinct *Drosophila* Olfactory Subsystems. *J. Neurosci.* 31, 13357–13375. doi:10.1523/JNEUROSCI.2360-11.2011
- Sinakevitch, I., Grau, Y., Strausfeld, N.J., Birman, S., 2010. Dynamics of glutamatergic signaling in the mushroom body of young adult *Drosophila*. *Neural Develop.* 5, 10. doi:10.1186/1749-8104-5-10
- Skoulakis, E.M.C., Davis, R.L., 1996. Olfactory Learning Deficits in Mutants for *leonardo*, a *Drosophila* Gene Encoding a 14-3-3 Protein. *Neuron* 17, 931–944. doi:10.1016/S0896-6273(00)80224-X
- Skoulakis, E.M.C., Kalderon, D., Davis, R.L., 1993. Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11, 197–208. doi:10.1016/0896-6273(93)90178-T
- Smidt, M.P., Burbach, J.P.H., 2009. A passport to neurotransmitter identity. *Genome Biol.* 10, 229. doi:10.1186/gb-2009-10-7-229
- Smith, J.L., Schoenwolf, G.C., 1997. Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517. doi:10.1016/S0166-2236(97)01121-1
- Squire, L.R., 1987. The organization and neural substrates of human memory. *Int. J. Neurol.* 21-22, 218–222.
- Stocker, R.F., 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res.* 275, 3–26.
- Stocker, R.F., Heimbeck, G., Gendre, N., de Belle, J.S., 1997. Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *J. Neurobiol.* 32, 443–456.
- Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O.E., Freeman, M.R., 2014. Neuron-Glia Interactions through the Heartless FGF Receptor Signaling Pathway Mediate Morphogenesis of *Drosophila* Astrocytes. *Neuron* 83, 388–403. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.026
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., Ito, K., 1998. Evolution, Discovery, and Interpretations of Arthropod Mushroom Bodies. *Learn. Mem.* 5, 11–37.
- Strauss, R., 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 633–638. doi:10.1016/S0959-4388(02)00385-9
- Strauss, R., Heisenberg, M., 1993. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* 13, 1852–1861.

Bibliographie

- Taguchi, A., White, M.F., 2008. Insulin-Like Signaling, Nutrient Homeostasis, and Life Span. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 191–212. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100533
- Tanaka, N.K., Awasaki, T., Shimada, T., Ito, K., 2004. Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Curr. Biol. CB* 14, 449–457. doi:10.1016/j.cub.2004.03.006
- Tanaka, N.K., Tanimoto, H., Ito, K., 2008. Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J. Comp. Neurol.* 508, 711–755. doi:10.1002/cne.21692
- Tempel, B.L., Bonini, N., Dawson, D.R., Quinn, W.G., 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 1482–1486.
- Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreiter, E.R., Bargmann, C.I., Jayaraman, V., Svoboda, K., Looger, L.L., 2009. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat. Methods* 6, 875–881. doi:10.1038/nmeth.1398
- Tompkins, L., Siegel, R.W., Gailey, D.A., Hall, J.C., 1983. Conditioned courtship in *Drosophila* and its mediation by association of chemical cues. *Behav. Genet.* 13, 565–578.
- Trannoy, S., Redt-Clouet, C., Dura, J.-M., Preat, T., 2011. Parallel Processing of Appetitive Short- and Long-Term Memories In *Drosophila*. *Curr. Biol.* 21, 1647–1653. doi:10.1016/j.cub.2011.08.032
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C., Del Vecchio, M., 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35–47. doi:10.1016/0092-8674(94)90398-0
- Tully, T., Quinn, W.G., 1985. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 157, 263–277.
- Turner, G.C., Bazhenov, M., Laurent, G., 2008. Olfactory Representations by *Drosophila* Mushroom Body Neurons. *J. Neurophysiol.* 99, 734–746. doi:10.1152/jn.01283.2007
- Vernier, P., Philippe, H., Samama, P., Mallet, J., 1993. Bioamine receptors: evolutionary and functional variations of a structural leitmotiv. *EXS* 63, 297–337.
- Vosshall, L.B., Stocker, R.F., 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 505–533. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306
- Vosshall, L.B., Wong, A.M., Axel, R., 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102, 147–159.
- Waddell, S., Armstrong, J.D., Kitamoto, T., Kaiser, K., Quinn, W.G., 2000. The amnesiac Gene Product Is Expressed in Two Neurons in the *Drosophila* Brain that Are Critical for Memory. *Cell* 103, 805–813. doi:10.1016/S0092-8674(00)00183-5
- Waddell, S., Quinn, W.G., 2001. Flies, Genes, and Learning. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1283–1309. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1283
- Wang, B., Goode, J., Best, J., Meltzer, J., Schilman, P.E., Chen, J., Garza, D., Thomas, J.B., Montminy, M., 2008. The Insulin-Regulated CREB Coactivator TORC Promotes Stress

Bibliographie

Resistance in *Drosophila*. *Cell Metab.* 7, 434–444. doi:10.1016/j.cmet.2008.02.010

Wang, Y., Chiang, A.-S., Xia, S., Kitamoto, T., Tully, T., Zhong, Y., 2003. Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Curr. Biol.* CB 13, 1900–1904.

Wasserman, E.A., Miller, R.R., 1997. What's Elementary About Associative Learning? *Annu. Rev. Psychol.* 48, 573–607. doi:10.1146/annurev.psych.48.1.573

Weir, P.T., Dickinson, M.H., 2012. Flying *Drosophila* Orient to Sky Polarization. *Curr. Biol.* 22, 21–27. doi:10.1016/j.cub.2011.11.026

Wildemann, B., Bicker, G., 1999. Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurobiol.* 39, 337–346. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(19990605)39:3<337::AID-NEU1>3.0.CO;2-9

Wolf, R., Heisenberg, M., 1990. Visual control of straight flight in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 167, 269–283.

Wolf, R., Wittig, T., Liu, L., Wustmann, G., Eyding, D., Heisenberg, M., 1998. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 5, 166–178.

Wu, C.-L., Shih, M.-F.M., Lai, J.S.-Y., Yang, H.-T., Turner, G.C., Chen, L., Chiang, A.-S., 2011. Heterotypic Gap Junctions between Two Neurons in the *Drosophila* Brain Are Critical for Memory. *Curr. Biol.* 21, 848–854. doi:10.1016/j.cub.2011.02.041

Wu, C.-L., Shih, M.-F.M., Lee, P.-T., Chiang, A.-S., 2013. An Octopamine-Mushroom Body Circuit Modulates the Formation of Anesthesia-Resistant Memory in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 23, 2346–2354. doi:10.1016/j.cub.2013.09.056

Yuan, Q., Joiner, W.J., Sehgal, A., 2006. A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Curr. Biol.* CB 16, 1051–1062. doi:10.1016/j.cub.2006.04.032

Yu, D., Akalal, D.-B.G., Davis, R.L., 2006. *Drosophila* α/β Mushroom Body Neurons Form a Branch-Specific, Long-Term Cellular Memory Trace after Spaced Olfactory Conditioning. *Neuron* 52, 845–855. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.030

Yu, D., Keene, A.C., Srivatsan, A., Waddell, S., Davis, R.L., 2005. *Drosophila* DPM Neurons Form a Delayed and Branch-Specific Memory Trace after Olfactory Classical Conditioning. *Cell* 123, 945–957. doi:10.1016/j.cell.2005.09.037

Zars, T., Fischer, M., Schulz, R., Heisenberg, M., 2000. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288, 672–675.

Zentall, T.R., 2002. A Cognitive Behaviorist Approach to the Study of Animal Behavior. *J. Gen. Psychol.* 129, 328–363. doi:10.1080/00221300209602102

Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S.S., Tsien, R.Y., 2001. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14997–15002. doi:10.1073/pnas.211566798

Annexes

Annexe 1

Plaçais, P.-Y., Trannoy, S., Isabel, G., Aso, Y., Siwanowicz, I., Belliart-Guérin, G., Vernier, P., Birman, S., Tanimoto, H., Preat, T. (2012). Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 15, 592–599.

Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*

Pierre-Yves Plaçais^{1,6}, Séverine Trannoy^{1,6}, Guillaume Isabel^{1,5,6}, Yoshinori Aso^{2,5}, Igor Siwanowicz², Ghislain Belliard-Guérin¹, Philippe Vernier³, Serge Birman⁴, Hiromu Tanimoto² & Thomas Preat¹

A fundamental duty of any efficient memory system is to prevent long-lasting storage of poorly relevant information. However, little is known about dedicated mechanisms that appropriately trigger production of long-term memory (LTM). We examined the role of *Drosophila* dopaminergic neurons in the control of LTM formation and found that they act as a switch between two exclusive consolidation pathways leading to LTM or anesthesia-resistant memory (ARM). Blockade, after aversive olfactory conditioning, of three pairs of dopaminergic neurons projecting on mushroom bodies, the olfactory memory center, enhanced ARM, whereas their overactivation conversely impaired ARM. Notably, blockade of these neurons during the intertrial intervals of a spaced training precluded LTM formation. Two pairs of these dopaminergic neurons displayed sustained calcium oscillations in naive flies. Oscillations were weakened by ARM-inducing massed training and were enhanced during LTM formation. Our results indicate that oscillations of two pairs of dopaminergic neurons control ARM levels and gate LTM.

Abilities of indiscriminate remembering, which, for example, occur with disproportionate frequency in autistic individuals¹, betray brain injury or functional disorders^{1,2}. However, little is known about the dedicated mechanisms that trigger the consolidation of memory traces into LTM only for relevant learned experiences. In *Drosophila*, in the context of aversive olfactory learning, two different types of consolidated memory have been characterized³: LTM, which relies on *de novo* protein synthesis, and ARM, which does not. We previously proposed that these two memory phases were mutually exclusive⁴; the engagement into the ARM pathway thus preventing the energetically costly⁵ formation of LTM when it is not necessary. However, whether ARM and LTM actually antagonize each other has been debated⁶, and the putative role of ARM inhibition during LTM formation remains unknown.

In mammals, dopamine, a neuromodulator involved in reward learning⁷, intervenes shortly after conditioning^{8,9} or as late as 12 h after conditioning¹⁰ in the maintenance of LTM. However, the physiological processes at work in dopaminergic neurons during memory consolidation remain unclear. In *Drosophila*, dopamine is involved in a broad range of behavioral functions^{11,12}. In the framework of aversive olfactory memory resulting from simultaneous exposure to electric shocks and an odorant^{3,13,14}, efforts have focused on the role of dopaminergic neurons in learning^{15–17}, leaving a putative function of dopaminergic neurons in memory consolidation mostly unexplored. A single study has reported that dopaminergic neurons are involved in the memory impairment induced by heat stress after conditioning¹⁸.

Three bilateral clusters of dopaminergic neurons (PAM, PPL1 and PPL2ab, amounting to ~200, 24 and 12 dopaminergic neurons, respectively, out of ~280 total in the protocerebrum¹⁹) were identified as projecting to the mushroom bodies, paired multilobed structures that are the essential memory centers²⁰, and were classified according to the mushroom body region that they innervate^{17,21}.

We found that blockade, via the expression of a thermosensitive *Shibire* mutant protein^{22,23}, or overactivation, via the thermosensitive channel *TrpA1* (refs. 17,23), of three pairs of PPL1 dopaminergic neurons enhanced or inhibited, respectively, ARM consolidation. We characterized a sustained oscillatory activity of two pairs of these neurons by *in vivo* imaging in naive flies, and we found that these oscillations correlated with ARM inhibition in trained flies. In addition, we found that the pathways leading to ARM and LTM are exclusive and, consequently, that the ARM-regulating PPL1 dopaminergic neurons are endowed with the ability to gate the formation of LTM during the intertrial intervals (ITIs) of spaced conditioning.

RESULTS

Dopaminergic neurons regulate ARM

We began with the tyrosine hydroxylase (*Th*, also known as *ple*)-*GAL4* fly line²⁴, which extensively labels most dopaminergic neurons clusters, including the PPL1 and PPL2ab clusters, except the PAM cluster, which is sparsely labeled^{16,19,24}. The *Th-GAL4* driver was used in combination with *UAS-shi^{ts}* or *UAS-TrpA1* to transiently block or stimulate, respectively, brain dopaminergic neurons after conditioning.

¹Genes and Dynamics of Memory Systems, Neurobiology Unit, Centre National de la Recherche Scientifique, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI), Paris, France. ²Behavioral Genetics, Max Planck Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany. ³Développement, Evolution, Plasticité du Système Nerveux, Institut de Neurobiologie Alfred-Fessard, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France. ⁴Genetics and Physiopathology of Neurotransmission, Neurobiology Unit, Centre National de la Recherche Scientifique, ESPCI, Paris, France. ⁵Present addresses: Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, Toulouse, France (G.I.) and Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, Virginia, USA (Y.A.).

⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to T.P. (thomas.preat@espci.fr).

Received 5 December 2011; accepted 18 January 2012; published online 26 February 2012; doi:10.1038/nn.3055

Th-GAL4/UAS-shi^{ts} flies were trained with one cycle of conditioning at the permissive temperature and were then shifted to the restrictive temperature during memory consolidation and retrieval (blockade was maintained during the test to avoid a potential rebound of dopamine release). This resulted in an increased memory score when flies were tested 3 h after training (Fig. 1a), whereas *Th-GAL4/UAS-shi^{ts}* flies showed no memory enhancement at the permissive temperature (Supplementary Fig. 1a) and normal olfaction at the restrictive temperature (Supplementary Fig. 1b). This extra memory was found to be resistant to cold-shock anesthesia (Fig. 1b), a hallmark of ARM^{4,25}. Blocking dopaminergic neurons after five massed cycles of conditioning, which generates ARM³ persisting for more than 1 d, yielded an increased 24-h memory performance (Fig. 1c) that did not occur in flies that were kept at the permissive temperature (Supplementary Fig. 1c). This memory enhancement was a result of blockade during the consolidation phase (Fig. 1d) and not during memory retrieval (Supplementary Fig. 1d). Taken together, these data suggest that, in wild-type flies, dopaminergic neurons' activity after conditioning controls memory consolidation by inhibiting ARM formation.

To test this hypothesis, we assessed the effect in *Th-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies of a brief overactivation of dopaminergic neurons immediately after conditioning. We observed that 3-h memory was strongly decreased (Fig. 1e), leaving only labile memory (Fig. 1f), whereas *Th-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies that were kept at the permissive temperature after training displayed normal memory scores (Supplementary Fig. 1e). Overall, these findings indicate that ARM consolidation is regulated by dopaminergic neurons after training.

Three pairs of PPL1 neurons control ARM levels

Specific behavioral functions have already been attributed to restricted subsets of *Drosophila* dopaminergic neurons^{17,23}. We thus investigated whether ARM regulation could be ascribed to specific dopaminergic neurons. The expression pattern of the *NP0047-GAL4* line includes only three pairs of the mushroom body-innervating dopaminergic neurons in the PPL1 cluster, namely MB-V1 (V1) neurons, MB-MV1 (MV1) neurons and a single pair of MB-MP1 (MP1) neurons²¹ (Fig. 2a–c and Supplementary Movies 1 and 2). Expression in those three pairs of dopaminergic neurons is silenced by *Th* promoter-driven *GAL80* (*Th-GAL80*)¹⁷ (Fig. 2d,e and Supplementary Movies 3 and 4). Notably, blocking *NP0047-GAL4* neurons output during the consolidation phase after massed training led to a strong increase in 24-h memory, recapitulating the effect observed with *Th-GAL4* (Fig. 2f). This increase was abolished by *Th-GAL80* and is therefore attributable to the V1, MV1 and MP1 dopaminergic neurons (Fig. 2f). *NP0047-GAL4/UAS-shi^{ts}* flies showed no memory enhancement at the permissive temperature (Supplementary Fig. 2a).

Figure 1 *Th-GAL4* neurons regulate ARM consolidation. Time courses of temperature changes are shown alongside each graph of memory performance. C, conditioning; T, test. (a,b) Blocking the output of *Th-GAL4* neurons after a single cycle of training (1x) enhanced 3-h memory ($F_{2,41} = 7.203$, $P = 0.002$, $n \geq 14$, a). This extra memory was resistant to a 2-min cold-shock performed 2 h after training, and thus corresponded to ARM ($F_{2,42} = 7.768$, $P = 0.0013$, $n \geq 14$, b). (c,d) 24-h memory after massed training was also increased ($F_{2,51} = 5.746$, $P = 0.0056$, $n \geq 18$, c), even when neurons were blocked during the consolidation phase only ($F_{2,42} = 6.327$, $P = 0.0040$, $n \geq 14$, d). (e,f) Conversely, activation of *Th-GAL4* neurons immediately after single-cycle training impaired memory ($F_{2,39} = 24.49$, $P < 0.0001$, $n \geq 14$, e), specifically ARM ($F_{2,39} = 4.332$, $P = 0.02$, $n \geq 14$, f). Data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Transient activation of *NP0047-GAL4* neurons after one cycle of conditioning caused a memory drop that recapitulated the effect that was observed with *Th-GAL4* and was rescued by *Th-GAL80* (Fig. 2g). This memory drop corresponded to a specific ARM disruption (Supplementary Fig. 2b). *NP0047-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies maintained at the permissive temperature after training showed normal memory performance (Supplementary Fig. 2c). Taken together, our data suggest that the activity of three specific pairs of dopaminergic neurons, namely V1, MV1 and MP1 neurons, or a subset of these neurons, tunes ARM consolidation.

MV1 and MP1 neurons display slow calcium oscillations

To functionally characterize these three dopaminergic neurons, we then made *in vivo* recordings of their activity using the fluorescent calcium reporter *GCaMP3* (ref. 26). First, we recorded naive unstimulated flies. We observed that MP1 and MV1 neurons powered large spontaneous calcium variations in their mushroom body innervations compared with control neuropils (Fig. 3a,b). This is not a general property of dopaminergic neurons, as projections from V1 neurons on mushroom body vertical lobes showed only noisy fluctuations, the amplitude of which did not differ from those of control neuropils (Fig. 3a,b). All three types of neurons had contralateral projections on symmetrical areas¹⁹ (Fig. 2a). Thus, signals collected from processes targeting left and right mushroom bodies were highly synchronized in MP1 and in MV1 neurons (Fig. 3a). Despite having similar contralateral projections, V1 neurons showed signals with little bilateral correlation (Fig. 3a), which further suggests that the fluctuations observed in V1 were noise and that V1 had no spontaneous activity that was detectable at this level of sensitivity.

MP1 and MV1 neurons send out processes in close vicinity to the junction area of mushroom body lobes. When the orientation and the quality of the preparation allowed us to clearly distinguish them, we checked that both MV1 and MP1 neurons shared

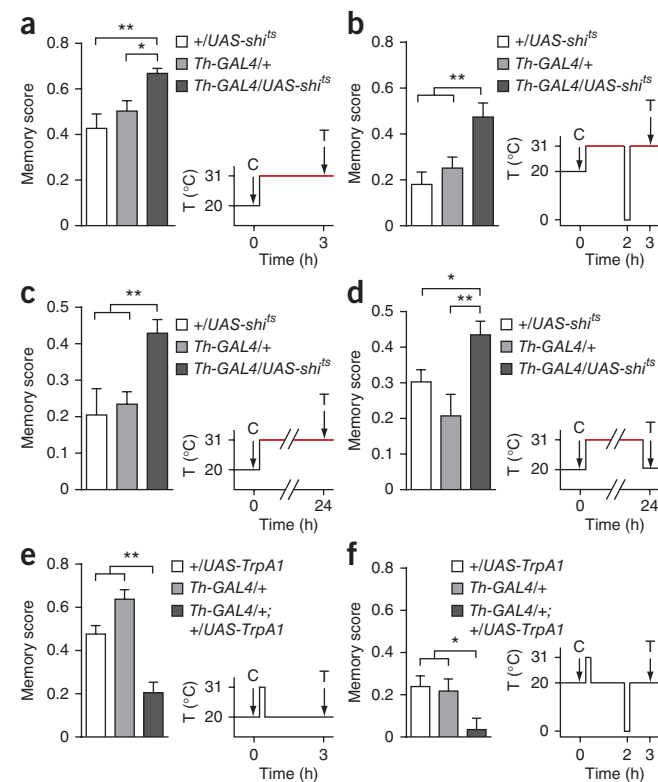
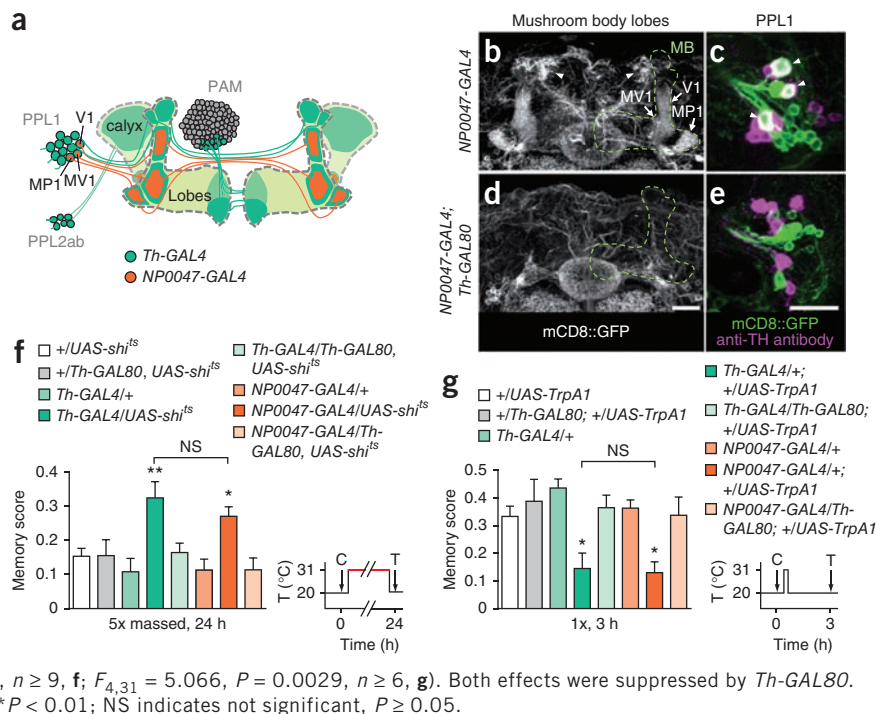


Figure 2 Three pairs of dopaminergic neurons recapitulate the ARM-regulating properties of *Th-GAL4* neurons. **(a)** Schematic drawing of mushroom body–connected dopaminergic processes. *Th-GAL4* (green) labels all cells in the PPL1 and PPL2ab clusters and 11–12 cells in the PAM cluster. *NP0047-GAL4* (orange) labels three cells in the PPL1 cluster. **(b–e)** The expression pattern of *NP0047-GAL4* in brain regions including the mushroom bodies (MB, frontal view, dorsal up, **b**) highlighted mushroom body projections from V1, MV1 and MP1 neurons (arrows, **b**), three tyrosine hydroxylase–immunoreactive cells in PPL1 cluster (arrowheads, **c**). Bright symmetrical dorsal projections are additional MP1 processes (arrowheads, **b**). *Th-GAL80* abolished expression in these three dopaminergic neurons (**d,e**). Scale bars represent 20 μm . See **Supplementary Movies 1–4** for expression patterns in the entire brain. **(f,g)** Blockade (**f**) or activation (**g**) of *NP0047-GAL4* neurons recapitulated enhancement ($F_{4,64} = 3.61$, $P = 0.01$, $n \geq 13$, **f**) and impairment ($F_{4,35} = 4.60$, $P = 0.004$, $n \geq 6$, **g**) of memory performance, respectively, obtained with *Th-GAL4* ($F_{4,53} = 4.464$, $P = 0.003$, $n \geq 9$, **f**; $F_{4,31} = 5.066$, $P = 0.0029$, $n \geq 6$, **g**). Both effects were suppressed by *Th-GAL80*. Data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS indicates not significant, $P \geq 0.05$.



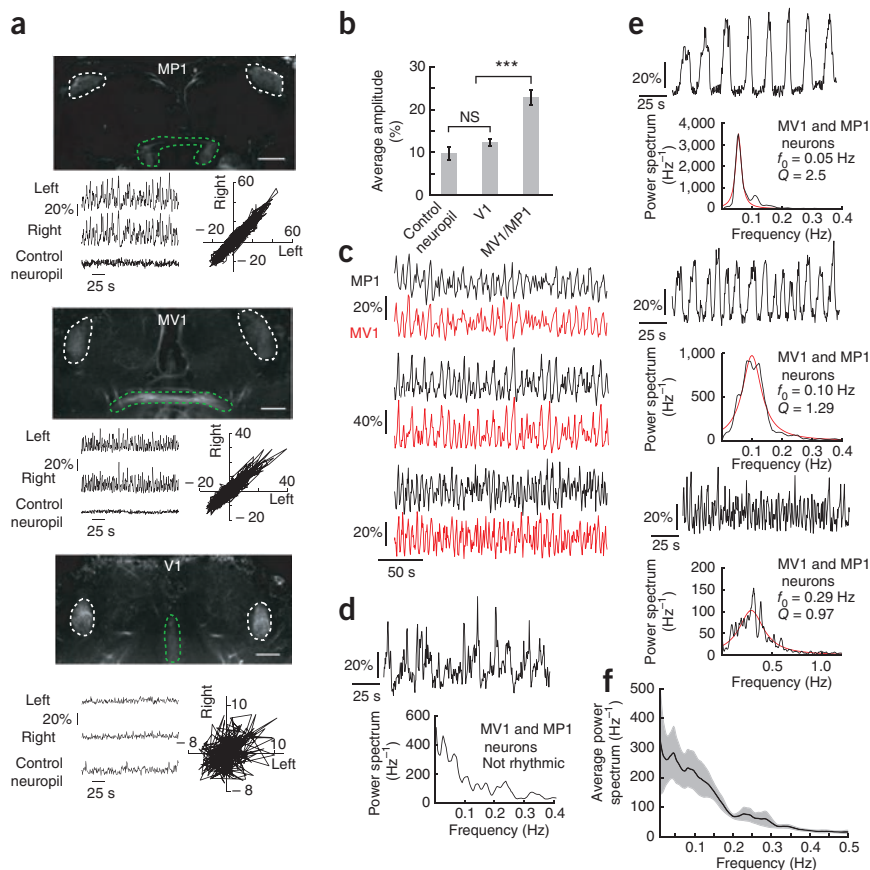
the ability to sustain spontaneous calcium activity. Simultaneous dual-plane recordings revealed synchrony between the two types of neurons (**Fig. 3c**). As no feature proved distinguishable between signals from MV1 and MP1 neurons (**Supplementary Fig. 3**), and as most *in vivo* recordings allowed only partial discrimination

between projections from each of the two neurons, we hereafter report our data as MV1 and MP1 imaging.

In naive flies, MV1 and MP1 neurons sometimes produced nonperiodic signals, which were characterized by a monotonically decreasing power spectrum with prominent low-frequency content (**Fig. 3d**).

However, we found that spontaneous calcium variations in MV1 and MP1 neurons could sometimes be shaped into rhythmic oscillatory patterns, as evidenced by a peak in the power spectra of the signals of individual flies (**Fig. 3e** and **Supplementary Movie 5**).

Figure 3 Spontaneous sustained activity in MV1 and MP1 neurons of naive flies. **(a)** Transverse sections of brains showing GCaMP3 fluorescence driven by *NP0047* at three different depths showing mushroom body projections of MP1 (top), MV1 (middle) and V1 (bottom) neurons (white regions of interest) and control neuropils (green). Scale bars represent 20 μm . Time courses of signals are shown below, along with correlation plots between hemispheres. **(b)** Amplitude of spontaneous activity in dopaminergic neurons and control structures ($n = 12$ flies). **(c)** Three examples of simultaneous recordings of MV1 (red) and MP1 (black) neurons showing marked synchrony. **(d,e)** Four illustrative examples of spontaneous activity in MV1 and MP1 neurons, including one example with no defined frequency (**d**) and three occurrences of rhythmic oscillatory signals (**e**). Power spectra are shown below each trace (black line), along with the best-fitting Lorentz curve for the rhythmic signals (red line) (see Online Methods for calculation of f_0 and Q). **(f)** Average power spectrum across all imaged flies ($n = 13$). Average data are presented as mean \pm s.e.m. *** $P < 0.001$; NS indicates not significant, $P \geq 0.05$.



Among such oscillatory signals, frequencies were broadly distributed, ranging over one order of magnitude, from 0.03 to 0.3 Hz. Because of this wide variety of behavior, and although a majority of naive animals displayed sparse (4 of 13 flies) or robustly persistent (6 of 13) oscillatory phases, no peaked feature emerged from the power spectrum averaged across all naive animals, which decreased monotonically from 0 to 0.5 Hz (Fig. 3f).

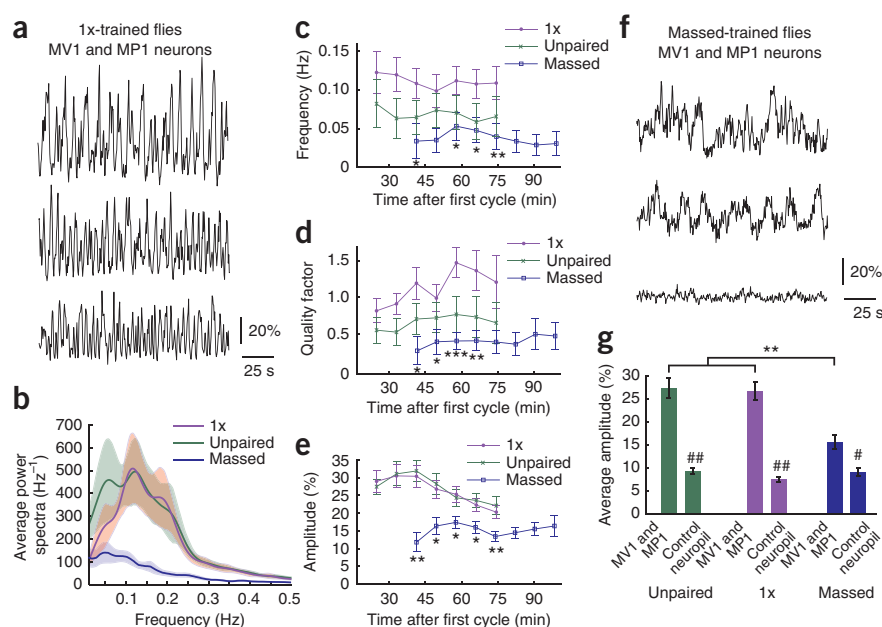
MV1 and MP1 oscillations correlate with ARM processing

We next investigated whether sustained activity of dopaminergic neurons was physiologically associated with ARM processing. After one cycle of associative training, a large majority of flies displayed rhythmic oscillations in MV1 and MP1 neurons (Fig. 4a). Indeed, a significantly higher number of flies that underwent single-cycle training displayed persistent oscillations compared with flies that underwent an unpaired conditioning (9 of 11 flies versus 4 of 11, $P = 0.036$, two-tailed Fisher's exact test). Consistently, significant differences in the ensemble power spectra after both protocols were a result of the low-frequency content (Fig. 4b), which, in naive flies, mostly came from nonrhythmic cases (Fig. 3d). Single-cycle-trained flies thus showed a peaked power spectrum (Fig. 4b) that was still quite broad because of frequency dispersion (central frequency $f_0 = 0.13$ Hz, quality factor $Q = 0.72$). As a consequence, the frequency and the quality factor of MV1 and MP1 activity were globally higher in single-cycle-trained flies than in unpaired-conditioned flies (Fig. 4c,d) during the assayed period, which extended over more than 1 h after conditioning. Noticeably, the amplitudes of MV1 and MP1 activity followed identical time courses in single-cycle-trained flies and unpaired-conditioned flies (Fig. 4e), which suggests that single-cycle training induces essentially qualitative changes through an increased tendency of MV1 and MP1 neurons to oscillate. As in naive flies, no above-noise activity could be measured in V1 neurons after single-cycle training (Supplementary Fig. 4).

As shown above (Fig. 1b), ARM levels were increased by blocking dopaminergic neurons activity during the time period in which preferential oscillatory behavior of MV1 and MP1 neurons occurs. We therefore hypothesized that MV1 and MP1 oscillations mediate ARM inhibition. Given that ARM is decreased by a short overactivation of *NP0047-GAL4* neurons in heat-stimulated *NP0047-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies (Fig. 2g), we asked whether MV1 and MP1 oscillations were enhanced in these flies. Unfortunately, *UAS-GCaMP3*, *UAS-TrpA1/+; NP0047-GAL4/+* flies had a 3-h memory defect at permissive temperature that was absent in *UAS-GCaMP3/+; NP0047-GAL4/+* flies (Supplementary Fig. 5a) and in *UAS-TrpA1/+; NP0047-GAL4/+* flies (Supplementary Fig. 1e). In addition, simultaneous expression of *GCaMP3* and *TrpA1* in *NP0047-GAL4* neurons abolished the sustained activity of MV1 and MP1 neurons in naive flies ($n = 10$; Supplementary Fig. 5b). However, a brief stimulation of MV1 and MP1 neurons by *TrpA1* activation (see Online Methods) gave rise to a period of sustained activity that persisted for at least 45 min and could be oscillatory (Supplementary Fig. 5b,c). This did not occur in heat-stimulated *UAS-GCaMP3; NP0047-GAL4/+* control flies that did not carry *UAS-TrpA1* (Supplementary Fig. 5d). These results suggest that MV1 and MP1 oscillations inhibit ARM, even though they should be considered cautiously because MV1 and MP1 neurons' physiology is altered in *UAS-GCaMP3*, *UAS-TrpA1/+; NP0047-GAL4/+* flies.

If MV1 and MP1 oscillations are detrimental to ARM consolidation, we expect that massed training that promotes high levels of day-lasting ARM³ will negatively affect those oscillations. In massed-trained flies (Fig. 4f), MV1 and MP1 neurons were seldom oscillatory (4 of 11 flies) and showed otherwise irregular non-oscillating activity (4 of 11 flies) or were completely quiet (3 of 11 flies). Thus, the proportion of massed-trained flies showing oscillatory activity in MV1 and MP1 neurons was decreased compared with single-cycle-trained flies (4 of 11 massed-trained flies versus 9 of 11 single-cycle-trained flies, $P = 0.036$, two-tailed Fisher's exact test), which resulted in a

Figure 4 Oscillations in MV1 and MP1 neurons are correlated with ARM regulation. (a) Illustrative examples of recordings from MV1 and MP1 neurons 30–45 min after one cycle of associative conditioning. (b) Average power spectra across all tested animals obtained after single-cycle, unpaired and massed training. Significant differences between single-cycle and unpaired spectra on the whole frequency range (comparison from 0 to 0.3 Hz: $F_{1,3167} = 14.25$, $P = 0.0002$, two-way ANOVA) were actually a result of the low frequency range (no significant difference from 0.1 to 0.3 Hz: $F_{1,2220} = 0.05$, $P = 0.82$, two-way ANOVA). (c–e) Time courses of the frequency (c), quality factor (d) and amplitude (e) in MV1 and MP1 neurons after single-cycle, unpaired and massed training. Asterisks denote significant differences between massed and single-cycle training at a given time point. There were no significant differences between single-cycle training and unpaired conditioning at a given time point, but the global time courses were significantly different between the two conditions regarding frequency ($F_{1,153} = 11.14$, $P = 0.0011$, two-way ANOVA) and quality factor ($F_{1,153} = 12.21$, $P = 0.0006$, two-way ANOVA), but not amplitude ($F_{1,153} = 0.45$, $P = 0.50$, two-way ANOVA). (f) Illustrative examples of recordings from MV1 and MP1 neurons 30–45 min after massed training. (g) Average amplitude of signals recorded from MV1 and MP1 neurons and control structures after single-cycle, unpaired and massed training. Signals from dopaminergic neurons were lower after massed than after single-cycle or unpaired protocols ($F_{2,32} = 11.93$, $P = 0.0002$). # symbols denote a significant difference between MV1 and MP1 and the control for a given protocol (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$). $n = 11$ flies for each condition. Average data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



monotonically decreasing power spectrum for massed-trained flies (Fig. 4b) and a marked drop of the average frequency and quality factor compared with single-cycle-trained flies (Fig. 4d,e). Moreover, massed training also induced a decrease of the amplitude of MV1 and MP1 activity (Fig. 4c). This amplitude, however, remained above those of control neuropils (Fig. 4g), consistently with the fact that full blockade of *NP0047-GAL4* dopaminergic neurons output after massed conditioning could further increase 24-h ARM (Fig. 2f). As for single-cycle training, no detectable activity appeared in V1 neurons after massed training (Supplementary Fig. 4).

Thus, although one cycle of conditioning favored oscillatory behavior of MV1 and MP1 neurons, juxtaposing four additional cycles right after the first one, which allows persistent ARM consolidation, suppressed the effect. Altogether, our data suggest that MV1 and MP1 oscillations are negatively correlated with ARM consolidation.

We next asked whether the *radish* (*rsh*) gene, which encodes a protein that is required for ARM consolidation and is expressed in the mushroom bodies^{25,27}, is somehow linked to the pathway controlled by MV1 and MP1 oscillations. In *rsh* mutant flies, MV1 and MP1 oscillations were normal in terms of frequency distribution, average spectrum (Supplementary Fig. 6a) and amplitude (Supplementary Fig. 6b). Consistent with this, blocking dopaminergic neurons of either *rsh/+* females or *rsh/Y* males after single-cycle training still resulted in increased memory performance (Supplementary Fig. 6c). These results suggest that *rsh* and MV1 and MP1 neurons affect ARM consolidation through independent pathways.

ARM is absent when LTM is formed

As previously mentioned, two forms of consolidated memories exist in *Drosophila*, ARM and protein synthesis-dependent LTM. It is well established that ARM forms after massed training, whereas LTM only forms after multiple cycles of conditioning spaced by an ITI of typically 15 min (ref. 3). We previously proposed that ARM and LTM are exclusive memory phases, meaning that ARM is inhibited after spaced training⁴. This last point is, however, debated, as it is often stated that ARM is normally present after spaced training^{3,6}. Here we provide three additional lines of evidence to further demonstrate that ARM is inhibited when LTM is formed.

First, arguments against the exclusive memories model are frequently based on the fact that most flies with abnormal LTM show, after spaced conditioning, a significant residual memory that could correspond to ARM^{3,6}. Using cycloheximide (CXM), an inhibitor of protein synthesis, to probe the formation of LTM, we analyzed the quality of residual memory of two loss-of-function mutants, *crammer* (*cer*)²⁸ and *tequila* (*teq*)²⁹, that specifically affect LTM. We first checked

that both *cer* and *teq* fed with CXM had a normal memory performance after massed conditioning (Fig. 5a), confirming that both CXM treatment and the concerned mutations do not affect ARM. After spaced conditioning, *cer* and *teq* memory was strongly decreased by CXM treatment (Fig. 5a). Thus, the residual memory observed in *cer* and *teq* LTM mutants corresponds to partial LTM, and not to normal ARM, confirming that ARM is inhibited when LTM is formed⁴.

Second, it was recently shown that feeding flies with DL-p-chlorophenylalanine (pCPA), an inhibitor of serotonin synthesis, specifically impairs ARM 3 h after single-cycle training as well as 24 h after massed training³⁰. We confirmed that pCPA treatment impaired the memory of wild-type flies after massed training (Fig. 5b). Notably, the 24-h memory of wild-type flies fed with pCPA was normal after spaced training (Fig. 5b), strongly suggesting that ARM is absent after spaced training.

Third, to inhibit ARM, we briefly activated *Th-GAL4* neurons after each conditioning cycle of the spaced and massed protocols using *TrpA1*. We performed a massed training with a short 5-min ITI, a duration that is insufficient to properly achieve LTM formation³¹, but leaves enough time to briefly overactivate *Th-GAL4* neurons between each cycle. As expected from the single-cycle training experiment (Fig. 1e,f), the 24-h memory of *Th-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies was strongly decreased after massed training (Fig. 5c). We performed a control experiment to check that *Th-GAL4/+; +/UAS-TrpA1* flies learned normally after a single cycle of training preceded by thermal activation (Supplementary Fig. 7a), ensuring that the measured defect after massed conditioning was actually a result of ARM impairment after conditioning and not of a putative interference of the procedure with learning itself. Activation of *Th-GAL4* neurons right after each cycle of a spaced protocol did not alter 24 h memory (Fig. 5d). Overall, these data indicate that ARM is either blocked or erased by spaced training, which therefore only induces LTM formation.

Spaced training promotes MV1 and MP1 neurons oscillations

We next asked whether ARM-inhibiting MV1 and MP1 neurons are involved in the complete ARM blockade caused by spaced training. Indeed, a significantly higher number of spaced-trained flies showed long-lasting oscillations in MV1 and MP1 neurons than in flies that underwent a control spaced unpaired conditioning (10 of 11 spaced-trained flies versus 3 of 11 unpaired flies, $P = 0.004$, two-tailed Fisher's exact test). Spaced-trained flies consistently displayed persistent oscillations in a restricted frequency range around 0.1 Hz (Fig. 6a), which resulted in a well-defined peak in the average spectrum ($f_0 = 0.11$ Hz, $Q = 1.11$; Fig. 6b). In comparison, unpaired flies produced a non-oscillatory monotonous ensemble spectrum (Fig. 6b).

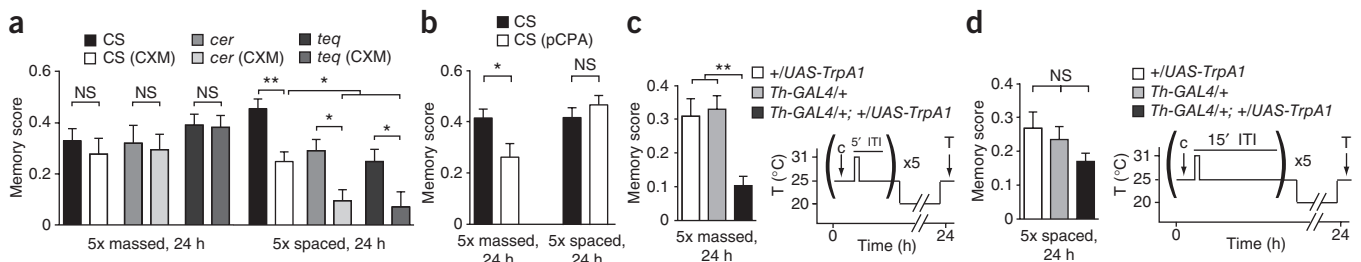


Figure 5 ARM is absent after spaced conditioning. (a) Effect of CXM on specific LTM mutants *cer* and *teq*. Memory scores in different groups were similar 24 h after massed conditioning ($F_{5,44} = 0.657$, $P = 0.66$, $n = 8$). Conversely, there were significant differences between groups 24 h after spaced conditioning ($F_{5,119} = 10.22$, $P < 0.0001$, $n \geq 18$). CS, Canton Special. (b) ARM-affecting pCPA treatment resulted in a defect of 24-h memory after massed training ($P = 0.024$, $n = 12$), but not after spaced training ($P = 0.36$, $n = 15$). (c,d) 24-h memory was significantly affected after brief overactivation of *Th-GAL4* neurons after each cycle of a massed training ($F_{2,35} = 9.03$, $P = 0.0006$, $n = 12$, c), but not after spaced training ($F_{2,38} = 1.71$, $P = 0.19$, $n = 12$, d). Data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS indicates not significant, $P \geq 0.05$.

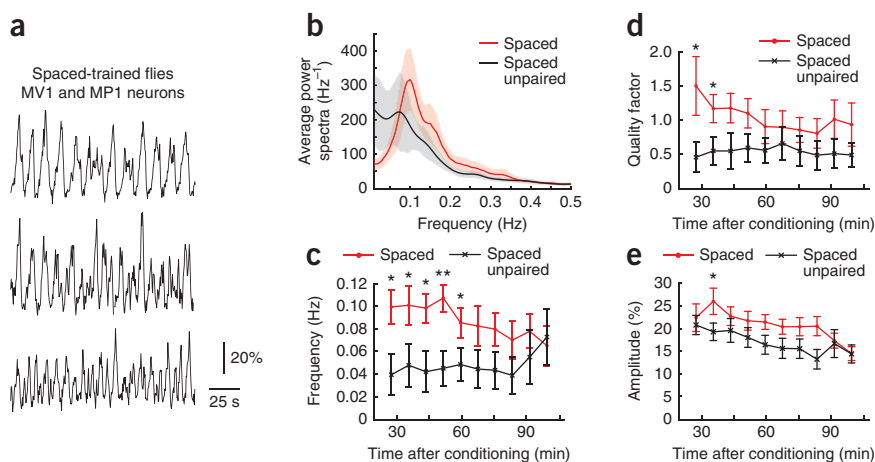


Figure 6 Spaced training consistently promotes oscillatory behavior in MV1 and MP1 neurons. (a) Illustrative recordings from MV1 and MP1 neurons obtained 30–60 min after spaced conditioning. (b) Average power spectrum across all tested flies obtained after spaced conditioning was significantly different from that produced by a spaced unpaired protocol (comparison from 0 to 0.3 Hz: $F_{1,3167} = 19.3$, $P = 1.2 \times 10^{-5}$, two-way ANOVA, $n = 11$ flies for each condition). (c–e) Time courses of the frequency (c), quality factor (d) and amplitude (e) of activity in MV1 and MP1 neurons after spaced training and spaced unpaired protocol. Global comparison of time courses proved significantly different for all three parameters (frequency, $F_{1,175} = 35.23$, $P < 0.0001$; quality factor, $F_{1,175} = 16.94$, $P = 0.0001$; amplitude, $F_{1,175} = 17.91$, $P < 0.0001$; two-way ANOVA). Average data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Comparison of the time courses of the frequency and quality factor up to 1.5 h after conditioning revealed that activity patterns of MV1 and MP1 neurons in spaced-trained flies were faster (Fig. 6c) and more regularly cadenced (Fig. 6d) than in unpaired flies. During the first hour after training, the magnitude of differences, and thus the discrimination between trained and unpaired flies, were even more strongly marked than during the same time period after only one cycle of training (Figs. 4c,d and 6c,d). In addition, spaced-training induced a quantitative effect on the amplitude of MV1 and MP1 activity, which was higher in trained flies than in unpaired flies (Fig. 6e). Similar to other protocols, spaced training did not affect V1 neurons activity

after conditioning (Supplementary Fig. 4). Thus, the ARM-inhibiting spaced protocol strongly drives MV1 and MP1 neurons into an ARM-opposing oscillatory behavior.

ARM-regulating neurons gate LTM formation

We then sought to understand the physiological rationale of ARM inhibition by MV1 and MP1 oscillating neurons after spaced training. We blocked *Th-GAL4* neurons from the end of a spaced protocol throughout the consolidation phase. This treatment did not affect LTM (Fig. 7a). Given that spaced training lasts 1.5 h and that the training-evoked promotion of MV1 and MP1 oscillations started to occur after the first cycle of training (Fig. 4), we reasoned that the major part of physiologically relevant events could occur during the spaced training itself rather than during the consolidation phase. Thus, after checking that *Th-GAL4/UAS-shi^{TS}* flies could appropriately form LTM when spaced trained at the permissive temperature (Fig. 7b), and that blocking *Th-GAL4* neurons for 8 min before single-cycle training did not impair learning (Supplementary Fig. 7b), we

designed a protocol to block neuronal activity during the first 8 min of each 15-min ITI of a spaced training (Fig. 7c). Despite multiple temperature shifts during the spaced training (Fig. 7c), control flies formed LTM (Fig. 7d), but blocking *Th-GAL4* neurons during ITIs and early consolidation prevented LTM formation, leaving only CXM-insensitive ARM (Fig. 7d).

To determine whether this effect was a result of ARM-controlling neurons, we conducted the same series of experiments with *NP0047-GAL4/UAS-shi^{TS}* flies. We first determined that LTM formation was normal when these flies were trained at the permissive temperature (Fig. 7b) and that learning during single-cycle

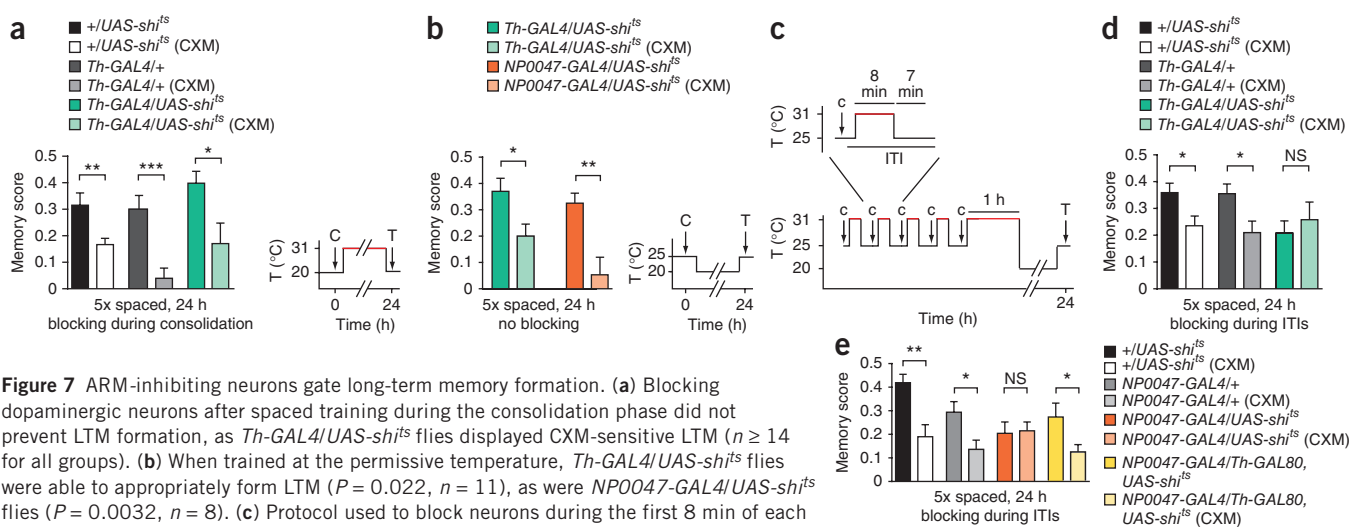


Figure 7 ARM-inhibiting neurons gate long-term memory formation. (a) Blocking dopaminergic neurons after spaced training during the consolidation phase did not prevent LTM formation, as *Th-GAL4/UAS-shi^{TS}* flies displayed CXM-sensitive LTM ($n \geq 14$ for all groups). (b) When trained at the permissive temperature, *Th-GAL4/UAS-shi^{TS}* flies were able to appropriately form LTM ($P = 0.022$, $n = 11$), as were *NP0047-GAL4/UAS-shi^{TS}* flies ($P = 0.0032$, $n = 8$). (c) Protocol used to block neurons during the first 8 min of each 15-min ITI of a spaced training and during the first hour of the consolidation phase. (d) Blocking *Th-Gal4* neurons according to the protocol shown in c precluded LTM formation (+/*UAS-shi^{TS}*, $P = 0.021$; *Th-GAL4/+*, $P = 0.016$; *Th-GAL4/UAS-shi^{TS}*, $P = 0.54$; $n \geq 12$ for all groups). (e) As with *Th-Gal4* neurons, LTM formation was abolished when *NP0047-GAL4* neurons were blocked during the ITI and the first hour after conditioning. This was because of the three pairs of *NP0047-GAL4* dopaminergic neurons, as the ability to form LTM was recovered in combination with *Th-GAL80* (+/*UAS-shi^{TS}*, $P = 0.0014$; *NP0047-GAL4/+*, $P = 0.014$; *NP0047-GAL4/UAS-shi^{TS}*, $P = 0.86$; *NP0047-GAL4/Th-GAL80, UAS-shi^{TS}*, $P = 0.038$; $n \geq 11$ for all groups). Data are presented as mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; NS indicates not significant, $P \geq 0.05$.

training was normal after blockade of *NP0047-GAL4* neurons (**Supplementary Fig. 7c**). As with *Th-GAL4* neurons, blocking ARM-opposing *NP0047-GAL4* neurons during the ITIs of a spaced training abolished CXM sensitivity of 24-h memory, whereas LTM was intact in genotypic controls (**Fig. 7e**). This LTM loss was actually attributable to the three pairs of ARM-regulating dopaminergic neurons, as the presence of *Th-GAL80* rescued LTM formation (**Fig. 7e**). In conclusion, those data indicate that in the absence of ARM inhibition, LTM cannot form and that *NP0047-GAL4* dopaminergic neurons gate LTM formation during the ITI of spaced conditioning.

DISCUSSION

We addressed the role of dopaminergic neurons in aversive memory consolidation and found that dopaminergic neurons are specifically involved in the regulation of the anesthesia-resistant component of olfactory memory. More specifically, we found that as few as three pairs of mushroom body-projecting dopaminergic neurons from the PPL1 cluster, V1, MV1 and MP1, inhibit ARM formation after aversive olfactory learning of normal flies. *In vivo* calcium imaging experiments in unstimulated flies revealed that MV1 and MP1, but not V1, neurons displayed a highly synchronized sustained activity that was sometimes shaped into rhythmic oscillations. In trained flies, the strength of MV1 and MP1 oscillations was tightly correlated with ARM processing.

In terms of neural circuitry, the inputs of MV1 and MP1 neurons are unknown, raising the question of whether they are isolated self-oscillators or are part of a larger oscillating circuit. The fact that MV1 and MP1 oscillations are in phase, both in the same hemisphere and across hemispheres, favors the second hypothesis.

The molecular pathways by which dopaminergic neurons activity could regulate ARM remain elusive. We found that ARM regulation by dopaminergic neurons do not rely on the products of the *rsh* gene. Activation of protein kinase A has been shown to inhibit ARM in the mushroom body³². Dopamine release from the MV1 and MP1 neurons could trigger cAMP production and increased protein kinase A activity in the mushroom body^{33,34}, thereby inhibiting ARM.

In the framework of memory phases, we previously proposed that ARM and LTM are exclusive consolidated memories⁴, a model that has been debated⁶. Our results support the idea that ARM is inhibited after spaced conditioning, when LTM is formed. Why is ARM inhibited when LTM is formed? When the three pairs of ARM-inhibiting dopaminergic neurons were blocked between the multiple cycles of a spaced training, LTM formation was voided. Consistent with these results, *in vivo* calcium imaging showed that a single cycle and, more strongly, a spaced training fostered MV1 and MP1 oscillatory activity, whereas a massed training inhibited MV1 and MP1 oscillations.

These results consistently point to a plausible model of consolidated memory phases in *Drosophila*, in which oscillations of dopaminergic neurons gate the formation of LTM by tuning the ARM pathway (**Supplementary Fig. 8**). In this model, two parallel mutually inhibiting pathways can lead to the formation of day-lasting ARM or LTM. After a single cycle or massed conditioning, the ARM pathway is activated and prevents LTM formation. During the rest intervals of the spaced conditioning MV1 and MP1 oscillations are enhanced and the ARM pathway is therefore inhibited and LTM can form in relevant mushroom body neurons.

Although we have identified ARM-regulating neurons, the mechanisms by which ARM, or physiological events leading to it, prevents LTM formation remain to be elucidated. The spacing effect, that is, the fact that stronger memory is formed when multiple trainings are spaced over time compared with the same number of trainings without spacing, is widely established in the animal kingdom³⁵. Notably, the gating of LTM formation occurred during the ITIs of spaced training

in our experiments. Recently, it has been shown that the duration of the ITI required to form LTM in *Drosophila* is regulated by the *corkscrew* gene through waves of Ras/mitogen-activated protein kinase activity³⁵. It will be interesting to investigate a putative interaction between mitogen-activated protein kinase waves and MV1 and MP1 oscillatory activity, and to determine whether stimulating oscillations during the ITI facilitates LTM formation, for example, with shorter ITIs or with fewer conditioning cycles.

We identified dopaminergic neurons whose activity inhibits ARM and therefore, as in mammals, positively affects LTM formation¹⁰. That regulation of memory consolidation seems to involve precisely cadenced oscillations in MV1 and MP1 neurons is of particular conceptual interest. Indeed, it was recently suggested that a subset of hypothalamic dopaminergic neurons in rats, robustly oscillating at 0.05 Hz, may be responsible for lactation inhibition³⁶. Thus, inhibition through rhythmic oscillations appears to be a widespread functional feature of dopaminergic networks. In addition, a slow oscillatory firing mode, in the 0.5–1.5-Hz frequency range, has been identified in the dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of rats³⁷. This oscillatory firing pattern would underlie subsecond synchronization between ventral tegmental area and prefrontal cortex³⁸, an area of major importance in learning and memory³⁹. Thus, and although such an assumption remains quite speculative, LTM regulation by dopaminergic neurons in mammals might involve mechanisms similar to those described here in *Drosophila*.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Neuroscience website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Pascual (Instituto de Biomedicina de Sevilla) and members of the Genes and Dynamics of Memory Systems group for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (T.P.), the Fondation pour la Recherche Médicale (T.P.), the Fondation Bettencourt-Schueller (T.P.), the Emmy-Noether Program from Deutsche Forschungsgemeinschaft (H.T.), the Bernstein focus Learning from Bundesministerium für Bildung und Forschung (H.T.) and the Max-Planck-Gesellschaft (H.T.). P.-Y.P. was supported by a grant from Région Ile-de-France, G.I. and S.T. by the Fondation pour la Recherche Médicale, and Y.A. by Deutscher Akademischer Austausch Dienst.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.B., G.I. and T.P. were involved in the original design of the study. Behavioral experiments were performed by G.I. (**Figs. 1, 5a and 7a**, and **Supplementary Fig. 1**), S.T. (**Figs. 2, 5c,d and 7b,d,e**, and **Supplementary Figs. 2 and 7**), P.-Y.P. (**Fig. 5b** and **Supplementary Fig. 5a**) and G.B.-G. (**Supplementary Fig. 6c**). P.-Y.P. carried out all of the calcium imaging experiments and data analyses, except for the *rsh* experiment that was performed by G.B.-G. (**Supplementary Fig. 6a,b**). Y.A., I.S. and H.T. performed immunohistochemistry and analyzed the results. S.B. provided some fly stocks. P.V. provided financial support. P.-Y.P. and T.P. wrote the manuscript. T.P. designed the study and supervised the work. All of the authors discussed the results and commented on the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/natureneuroscience/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Neumann, N. *et al.* The mind of the mnemonists: an MEG and neuropsychological study of autistic memory savants. *Behav. Brain Res.* **215**, 114–121 (2010).
2. Treffert, D.A. The savant syndrome: an extraordinary condition. A synopsis: past, present, future. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **364**, 1351–1357 (2009).
3. Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C. & Del Vecchio, M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79**, 35–47 (1994).

4. Isabel, G., Pascual, A. & Preat, T. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* **304**, 1024–1027 (2004).
5. Mery, F. & Kawecky, T.J. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* **308**, 1148 (2005).
6. Margulies, C., Tully, T. & Dubnau, J. Deconstructing memory in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **15**, R700–R713 (2005).
7. Wise, R.A. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 483–494 (2004).
8. O'Carroll, C.M., Martin, S.J., Sandin, J., Frenguelli, B. & Morris, R.G.M. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.* **13**, 760–769 (2006).
9. Bethus, I., Tse, D. & Morris, R.G.M. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J. Neurosci.* **30**, 1610–1618 (2010).
10. Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H. & Cammarota, M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* **325**, 1017–1020 (2009).
11. Waddell, S. Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends Neurosci.* **33**, 457–464 (2010).
12. Riemensperger, T. *et al.* Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 834–839 (2011).
13. Tully, T. & Quinn, W.G. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* **157**, 263–277 (1985).
14. Keene, A.C. & Waddell, S. *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 341–354 (2007).
15. Schwaerzel, M. *et al.* Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **23**, 10495–10502 (2003).
16. Claridge-Chang, A. *et al.* Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* **139**, 405–415 (2009).
17. Aso, Y. *et al.* Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Curr. Biol.* **20**, 1445–1451 (2010).
18. Zhang, S., Yin, Y., Lu, H. & Guo, A. Increased dopaminergic signaling impairs aversive olfactory memory retention in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 82–86 (2008).
19. Mao, Z. & Davis, R.L. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front. Neural Circuits* **3**, 5 (2009).
20. Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 266–275 (2003).
21. Tanaka, N.K., Tanimoto, H. & Ito, K. Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J. Comp. Neurol.* **508**, 711–755 (2008).
22. Kitamoto, T. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive *shibire* allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* **47**, 81–92 (2001).
23. Krashes, M.J. *et al.* A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* **139**, 416–427 (2009).
24. Friggi-Grelin, F. *et al.* Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J. Neurobiol.* **54**, 618–627 (2003).
25. Folkers, E., Drain, P. & Quinn, W.G. Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8123–8127 (1993).
26. Tian, L. *et al.* Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat. Methods* **6**, 875–881 (2009).
27. Folkers, E., Waddell, S. & Quinn, W.G. The *Drosophila* radish gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17496–17500 (2006).
28. Comas, D., Petit, F. & Preat, T. *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* **430**, 460–463 (2004).
29. Didelot, G. *et al.* Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* **313**, 851–853 (2006).
30. Lee, P.-T. *et al.* Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 13794–13799 (2011).
31. Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H. & Tully, T. CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **81**, 107–115 (1995).
32. Horiuchi, J., Yamazaki, D., Naganos, S., Aigaki, T. & Saitoe, M. Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20976–20981 (2008).
33. Gervasi, N., Tchénio, P. & Preat, T. PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* **65**, 516–529 (2010).
34. Tomchik, S.M. & Davis, R.L. Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway. *Neuron* **64**, 510–521 (2009).
35. Pagani, M.R., Oishi, K., Gelb, B.D. & Zhong, Y. The phosphatase SHP2 regulates the spacing effect for long-term memory induction. *Cell* **139**, 186–198 (2009).
36. Lyons, D.J., Horjales-Araujo, E. & Broberger, C. Synchronized network oscillations in rat tuberoinfundibular dopamine neurons: switch to tonic discharge by thyrotropin-releasing hormone. *Neuron* **65**, 217–229 (2010).
37. Shi, W.-X. Slow oscillatory firing: a major firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurophysiol.* **94**, 3516–3522 (2005).
38. Gao, M. *et al.* Functional coupling between the prefrontal cortex and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* **27**, 5414–5421 (2007).
39. Benchenane, K. *et al.* Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron* **66**, 921–936 (2010).

ONLINE METHODS

Stocks. *Drosophila melanogaster*, wild-type *Canton Special* and mutant flies were reared at 18 °C with 60% humidity in a 12-h light-dark cycle and on a standard medium, except for *NP0047-GAL4* × *UAS-GCaMP3* crosses, which were raised at 25 °C for imaging experiments. *Th-GAL4*, *NP0047-GAL4*, *Th-GAL80*, *UAS-TrpA1*, *UAS-shi^{ts}* and *UAS-GCaMP3* flies were outcrossed for five generations to a *w¹¹¹⁸* strain carrying a *Canton Special* genetic background.

Behavioral experiments. Conditioning and test of memory performance and of olfactory acuity were performed as described previously^{40,41}. Three types of training protocols were used in this study: single cycle, massed training (one training cycle repeated five times without intervals between each cycle) and spaced training (one training cycle repeated five times with a 15-min ITI between each cycle). In one experiment (Fig. 5c), a short 5-min ITI occurred during massed training to allow for brief thermal activation between each cycle. During an unpaired cycle of conditioning, flies were delivered the same amount of shocks 3 min before they were sequentially exposed to the two odorants.

When not indicated otherwise, conditioning and testing were performed at 25 °C. Time courses of the temperature shifts employed during experiments involving thermosensitive tools are shown alongside each graph of memory performance, and periods of neurotransmission blockade by *shi^{ts}* are highlighted in red. For blockade during consolidation, flies were placed at the restrictive temperature (31 °C) immediately after conditioning in pre-heated vials. When the temperature of the test was different from that of the consolidation phase, flies were transferred to the testing temperature 30 min before the test.

For experiments involving blockade during the ITIs of spaced conditioning, barrels with flies were plugged on a 31 °C non-odorized airflow for 8 min at the end of each cycle, then moved back to 25 °C air flow for the remaining 7 min of the ITI. At the end of the training protocol, trained flies were collected and transferred for 1 h at 31 °C in pre-heated vials. For overactivation experiments with *TrpA1*, flies were transferred in pre-heated vials at 31 °C for 1 min immediately after training.

Cold anesthesia was performed 2 h after training and achieved by a 2-min cold shock at 0 °C in pre-chilled tubes⁴.

CXM was used to examine the formation of protein synthesis-dependent LTM³ and pCPA was used to examine the formation of ARM³⁰. The vehicle solution for drug feeding was mineral water (Evian) supplemented with 5% sucrose. The protocol for CXM treatment was derived from that described in ref. 42. After 1 d on fresh medium, flies were transferred into 15-ml Falcon tubes containing a Whatman filter paper (1 × 2.5 cm²) soaked with 125 μl of 35 mM CXM solution (94% purity, Sigma, C7698) in vehicle or with vehicle alone (control) for 15–18 h at 25 °C. For pCPA treatment, 1-d-old flies were transferred for 3 d at 18 °C in bottles containing a square of Whatman filter paper (3.5 × 3.5 cm²) soaked with 1 mL of a 10 mg ml⁻¹ solution of pCPA (Sigma, C6506) in vehicle, or with 1 ml of vehicle alone. This treatment lasted 3 d, during which bottles were renewed after 1.5 d. For both CXM and pCPA treatments, drug feeding only occurred before conditioning. After massed or spaced conditioning, flies were kept in regular bottles with fresh medium for 24 h.

Immunohistochemistry. *NP0047-GAL4* flies were crossed with *UAS-mCD8::GFP* or *UAS-mCD8::GFP*; *Th-GAL80*; *UAS-mCD8::GFP* flies. The brains of female progeny were prepared 5–10 d after hatching at 25 °C by a standard immunolabeling procedure using antibodies to tyrosine hydroxylase (mouse, 1:200, Immunostar) and GFP (rabbit, 1:1,000, Invitrogen) and imaged with confocal microscopy (Olympus FV1000). Nomenclature of brain regions follows ref. 43.

In vivo calcium imaging. Fly surgery and technical details of data acquisition were essentially performed as previously described⁴¹. Measurements were performed on 1–2-d-old female *w¹¹¹⁸/w¹¹¹⁸*; *UAS-GCaMP3/+*; *NP0047-GAL4/+* flies, except for imaging experiments on the *radish* (*rsh*) mutant, in which *w¹¹¹⁸/Y*; *UAS-GCaMP3/+*; *NP0047-GAL4/+* and *rsh/Y*; *UAS-GCaMP3/+*; *NP0047-GAL4/+* males were compared. For experiments on naive flies, flies were taken directly from crosses vials. For experiments on conditioned flies, a group of flies trained with octanol as negatively reinforced odorant, was collected immediately after the end of conditioning protocol in a food-containing vial and left for about

5 min. A fly was caught without anesthesia, then glued and operated essentially as previously described for *in vivo* imaging⁴¹. To eliminate motion artifacts that are detrimental to measurement of unprovoked fluorescence changes, the proboscis was glued to the thorax, and at the end of surgery the brain was covered with a 15-μl drop of *Drosophila* Ringer's solution⁴¹ supplemented with 1% agarose. The recording chamber was then placed beneath the water-immersion 20× objective (NA = 1, Leica) of a TCS-SP5 laser-scanning confocal microscope (Leica), fluorescence thus being collected from transverse sections of the brain observed from the top. Laser power (488 nm) was adjusted to obtain similar levels of emission throughout experiments. We observed no systematic bias of the laser power for a specific type of conditioned flies. The average delivered light power, as measured below the objective, was 50 μW with an s.d. of 8 μW. Imaging experiments were performed at 20 °C. On a sample of experiments, we measured that the average temperature change of the liquid bathing the brain between the beginning and the end of experiment was 0.3 °C, with a maximum of 1.3 °C. Measurements before and after a single 7-min recording did not yield noticeable temperature change either (−0.09 ± 0.14 °C, *n* = 13).

For single-plane acquisitions, the frame rate was 1 frame every 413 ms. Whenever it was possible to confidently discriminate MV1 from MP1 neurons, simultaneous recordings of activity in both neurons were performed by dual-plane acquisition in two planes at least 20 μm distant from one another (Fig. 3c). We performed 6–7-min recordings with typically 3–4-min intervals, repeated for variable duration, typically 1 h, and sometimes up to 2 h. At the end of the experiment, spontaneous or brush tickling-evoked leg or abdomen movement was checked to ensure that the fly was still alive.

For imaging of thermal activation of MV1 and MP1 neurons (Supplementary Fig. 5), *w¹¹¹⁸/w¹¹¹⁸*; *UAS-GCaMP3*, *UAS-TrpA1/+*; *NP0047-GAL4/+* flies raised at 18 °C were prepared in the same way, but the agarose step was omitted because of thermal sensitivity of *TrpA1*. Two acquisitions were made, after which the imaging cell holding the fly was placed inside a 60 °C incubator until the temperature inside the cell reached 30 °C (3 to 3.5 min). The liquid bathing the brain was then immediately replaced with a fresh one at 20 °C, and the fly was put back under the microscope.

Image analysis was performed offline with a custom-written Matlab program. Light intensity was averaged over a region of interest delimited by hand and surrounding the projections of dopaminergic neurons on the mushroom bodies in the observed plane. Neuropils chosen as controls depended on the plane where the acquisition was performed; in planes in which MV1 and MP1 neurons were visible, control neuropils were labeled structures from the ellipsoid body. For acquisitions at the V1 neurons' depth, control neuropils were processes on the central region of the brain of unidentified origin, but not corresponding to dopaminergic neurons, as their labeling was not suppressed by *Th-GAL80*. From a given region of interest, the resulting time trace was normalized to a percent change of fluorescence ($100(F - F_0) / F_0$), using a baseline value of the fluorescence F_0 that was estimated as the mean fluorescence over the whole acquisition. To remove long-term drift, a baseline resulting from the moving average over a 100-s time window was then subtracted from the signal. Thus, in subsequent frequency analyses, all frequency axes are presented starting at 0.01 Hz. Given that signals are noisy, their amplitudes were estimated as the difference between the means of the 30% upper and lower quantiles of data points. We checked that two other methods of calculation, one similar, but excluding the 5% upper and lower quantiles, as outliers and one using the r.m.s. value of the signal as a value of amplitude, yielded similar results (data not shown).

For each signal, the power spectrum was computed and smoothed over a frequency window of 0.02 Hz. Rhythmic spontaneous activity in the time domain resulted in a peak in the power spectrum that had a finite width, as oscillations are intrinsically noisy. A fit of a Lorentzian curve to the power spectrum was performed to yield an estimate of the central frequency of the peak, f_0 , and the width of the peak at half its maximal value, Δf . f_0 defined the characteristic frequency of the oscillation and frequency fluctuations around f_0 , and hence the regularity of the oscillation, could be quantified by the quality factor $Q = f_0 / \Delta f$ (ref. 44). A quality factor greater than 0.5 indicates that the zero frequency is excluded from the peak: this value was thus taken as a threshold to define a signal as rhythmically oscillating. When the fitting procedure converged to a value below 0.5, it was thus irrelevant to define oscillating parameters, and f_0 and Q were both assigned zero values.

Only one hemisphere per fly was considered for calculation of averages. When both hemispheres were visible, which was generally the case, the brighter one was selected.

Some flies showed sparse oscillatory sequences lasting for only one or two recordings, whereas others were robustly oscillating throughout most or all of the experiment. As the flies were not all imaged for the same duration, we set the following criterion: flies were considered to be robustly oscillating if more than half of the recordings in MV1 and MP1 neurons were oscillatory.

For time course analyses of amplitude, frequency and quality factor, recordings were pooled according to their starting time after the end of the conditioning protocol (trained flies) or the start of the dissection (naive flies), in time intervals of 500 s. To plot average amplitude histograms, we calculated a mean amplitude value for MV1 and MP1 neurons, V1 neurons, and control neuropil for each fly, and then averaged the mean values across all flies from the same condition.

Average power spectra across all animals from the same condition were obtained from signals in the 40–55-min range after the end of conditioning (or the dissection start for naive flies) and were additionally smoothed over a 0.03-Hz frequency window. Peaked average spectra (Figs. 4b and 6b) were characterized by their mean frequency f_0 and a quality factor Q calculated from f_0 and the width at half-height.

Statistical analyses. All average data are presented as mean \pm s.e.m. To compare two series of data, we used two-tailed unpaired t tests, except in **Supplementary Figure 5b,c**, where paired t tests were applied to compare activity in single flies before and after thermal activation. To compare more than two groups,

we used one-way ANOVA followed by pairwise planned comparisons between relevant groups with a Student-Newman-Keuls test. Comparisons of parallel time series, or of average spectra, between different conditions employed two-way balanced ANOVA.

ANOVA results are given as the value of the Fisher distribution $F_{x,y}$ obtained from the data, where x is the degrees of freedom for groups and y is the total degrees of freedom of the distribution. Statistical comparison of the proportion of robustly oscillating flies in two groups was made with a two-sided Fisher's exact test⁴⁵. The P value presented is the one defined in the 'minimum likelihood' approach, as defined in this reference.

40. Pascual, A. & Pr at, T. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* **294**, 1115–1117 (2001).
41. S ejourn e, J. *et al.* Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* **14**, 903–910 (2011).
42. Yu, D., Akalal, D.-B.G. & Davis, R.L. *Drosophila* α/β mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* **52**, 845–855 (2006).
43. Otsuna, H. & Ito, K. Systematic analysis of the visual projection neurons of *Drosophila melanogaster*. I. Lobula-specific pathways. *J. Comp. Neurol.* **497**, 928–958 (2006).
44. Pla ais, P.-Y., Baland, M., Gu erin, T., Joanny, J.-F. & Martin, P. Spontaneous oscillations of a minimal actomyosin system under elastic loading. *Phys. Rev. Lett.* **103**, 158102 (2009).
45. Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L. & Potier, M.-C. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics* **23**, 401–407 (2007).

Annexe 2

Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K.R., Vogt, K., Belliart-Guérin, G., Plaçais, P.-Y., Robie, A.A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., Rowell, W.J., Johnston, R.M., Ngo, T.-T.B., Chen, N., Korff, W., Nitabach, M.N., Heberlein, U., Preat, T., Branson, K.M., Tanimoto, H., Rubin, G.M. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife* 3, e04580.

Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*

Yoshinori Aso^{1*}, Divya Sitaraman^{1,2,6,7†}, Toshiharu Ichinose^{3,4}, Karla R Kaun^{1‡}, Katrin Vogt³, Ghislain Belliard-Guérin⁵, Pierre-Yves Plaçais⁵, Alice A Robie¹, Nobuhiro Yamagata^{3,4}, Christopher Schnaitmann^{3§}, William J Rowell¹, Rebecca M Johnston¹, Teri-T B Ngo¹, Nan Chen¹, Wyatt Korff¹, Michael N Nitabach^{1,2,6,7}, Ulrike Heberlein¹, Thomas Preat⁵, Kristin M Branson¹, Hiromu Tanimoto^{3,4}, Gerald M Rubin^{1*}

¹Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, United States; ²Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale School of Medicine, New Haven, United States; ³Max Planck Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany; ⁴Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan; ⁵Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, Centre National de la Recherche Scientifique, ESPCI, Paris, France; ⁶Department of Genetics, Yale School of Medicine, New Haven, United States; ⁷Program in Cellular Neuroscience, Neurodegeneration and Repair, Yale School of Medicine, New Haven, United States

*For correspondence: asoy@janelia.hhmi.org (YA); rubing@janelia.hhmi.org (GMR)

Present address: [†]Department of Psychological Sciences, University of San Diego, San Diego, United States;

[‡]Department of Neuroscience, Brown University, Providence, United States; [§]Department of Neurobiologie and Tierphysiologie, Institute of Biology 1, Albert Ludwig University of Freiburg, Freiburg, Germany

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 35

Received: 03 September 2014

Accepted: 07 November 2014

Published: 23 December 2014

Reviewing editor: Liqun Luo, Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, United States

© Copyright Aso et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Animals discriminate stimuli, learn their predictive value and use this knowledge to modify their behavior. In *Drosophila*, the mushroom body (MB) plays a key role in these processes. Sensory stimuli are sparsely represented by ~2000 Kenyon cells, which converge onto 34 output neurons (MBONs) of 21 types. We studied the role of MBONs in several associative learning tasks and in sleep regulation, revealing the extent to which information flow is segregated into distinct channels and suggesting possible roles for the multi-layered MBON network. We also show that optogenetic activation of MBONs can, depending on cell type, induce repulsion or attraction in flies. The behavioral effects of MBON perturbation are combinatorial, suggesting that the MBON ensemble collectively represents valence. We propose that local, stimulus-specific dopaminergic modulation selectively alters the balance within the MBON network for those stimuli. Our results suggest that valence encoded by the MBON ensemble biases memory-based action selection.

DOI: [10.7554/eLife.04580.001](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.001)

Introduction

To survive in a dynamic environment, an animal must discover and remember the outcomes associated with the stimuli it encounters. It then needs to choose adaptive behaviors, such as approaching cues that predict food and avoiding cues that predict danger. The neural computations involved in using such memory-based valuation of sensory cues to guide action selection require at least three processes: (1) sensory processing to represent the identity of environmental stimuli and distinguish among them; (2) an adaptive mechanism to assign valence—positive or negative survival value—to a sensory stimulus, store that information, and recall it when that same stimulus is encountered again; and (3) decision mechanisms that receive and integrate information about the valence of learned stimuli and then bias behavioral output. To understand such decision-making processes, one approach is to locate the sites of synaptic plasticity underlying memory formation, identify the postsynaptic neurons that transmit stored information to the downstream circuit and discover how their altered activities bias behavior.

eLife digest An animal's survival depends on its ability to respond appropriately to its environment, approaching stimuli that signal rewards and avoiding any that warn of potential threats. In fruit flies, this behavior requires activity in a region of the brain called the mushroom body, which processes sensory information and uses that information to influence responses to stimuli.

Aso et al. recently mapped the mushroom body of the fruit fly in its entirety. This work showed, among other things, that the mushroom body contained 21 different types of output neurons. Building on this work, Aso et al. have started to work out how this circuitry enables flies to learn to associate a stimulus, such as an odor, with an outcome, such as the presence of food.

Two complementary techniques—the use of molecular genetics to block neuronal activity, and the use of light to activate neurons (a technique called optogenetics)—were employed to study the roles performed by the output neurons in the mushroom body. Results revealed that distinct groups of output cells must be activated for flies to avoid—as opposed to approach—odors. Moreover, the same output neurons are used to avoid both odors and colors that have been associated with punishment. Together, these results indicate that the output cells do not encode the identity of stimuli: rather, they signal whether a stimulus should be approached or avoided. The output cells also regulate the amount of sleep taken by the fly, which is consistent with the mushroom body having a broader role in regulating the fly's internal state.

The results of these experiments—combined with new knowledge about the detailed structure of the mushroom body—lay the foundations for new studies that explore associative learning at the level of individual circuits and their component cells. Given that the organization of the mushroom body has much in common with that of the mammalian brain, these studies should provide insights into the fundamental principles that underpin learning and memory in other species, including humans.

DOI: [10.7554/eLife.04580.002](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.002)

The mushroom body (MB) is the main center of associative memory in insect brains (*de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg et al., 1985; Dubnau et al., 2001; McGuire et al., 2001*). While the MB processes several modalities of sensory information and regulates locomotion and sleep (*Martin et al., 1998; Liu et al., 1999; Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006; Zhang et al., 2007; Hong et al., 2008; Vogt et al., 2014*), MB function has been most extensively studied in the context of olfactory memory—specifically, associating olfactory stimuli with environmental conditions in order to guide behavior. In *Drosophila*, olfactory information is delivered to the MB by projection neurons from each of ~50 antennal lobe glomeruli (*Marin et al., 2002; Wong et al., 2002; Jefferis et al., 2007; Lin et al., 2007; Vosshall and Stocker, 2007; Yu et al., 2010*). Connections between the projection neurons and the ~2000 Kenyon cells (KCs), the neurons whose parallel axonal fibers form the MB lobes (*Crittenden et al., 1998; Aso et al., 2009*), are not stereotyped (*Figure 1A*) (*Murthy et al., 2008; Caron et al., 2013*); that is, individual flies show distinct wiring patterns between projection neurons and KCs. Sparse activity of the KCs represents the identity of odors (*Laurent and Naraghi, 1994; Perez-Orive et al., 2002; Turner et al., 2008*). The output of the MB is conveyed to the rest of the brain by a remarkably small number of neurons—34 cells of 21 cell types per brain hemisphere (*Figure 1B, Table 1*) (*Aso et al., 2014*).

The information flow from the KCs to the MB output neurons (MBONs) has been proposed to transform the representation of odor identity to more abstract information, such as the valence of an odor based on prior experience (See discussion in *Aso et al., 2014*). In contrast to KCs, MBONs have broadly tuned odor responses; any given odor results in a response in most MBONs, although the magnitude of the response varies among MBON cell types (Hige et al., unpublished) (*Cassenaer and Laurent, 2012*). Unlike the stereotyped response to odors of the olfactory projection neurons that deliver odor information to the MB, the odor tuning of the MBONs is modified by plasticity and varies significantly between individual flies, suggesting that MBONs change their response to odors based on experience (Hige et al., unpublished).

For olfactory associative memory in *Drosophila*, multiple lines of evidence are consistent with a model in which dopamine-dependent plasticity in the presynaptic terminals of KCs alters the strength of synapses onto MBON dendrites. This is thought to provide a mechanism by which the response of MBONs to a specific odor could represent that odor's predictive value. D1-like dopamine receptors and components of the cAMP signaling pathway, such as the Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyate

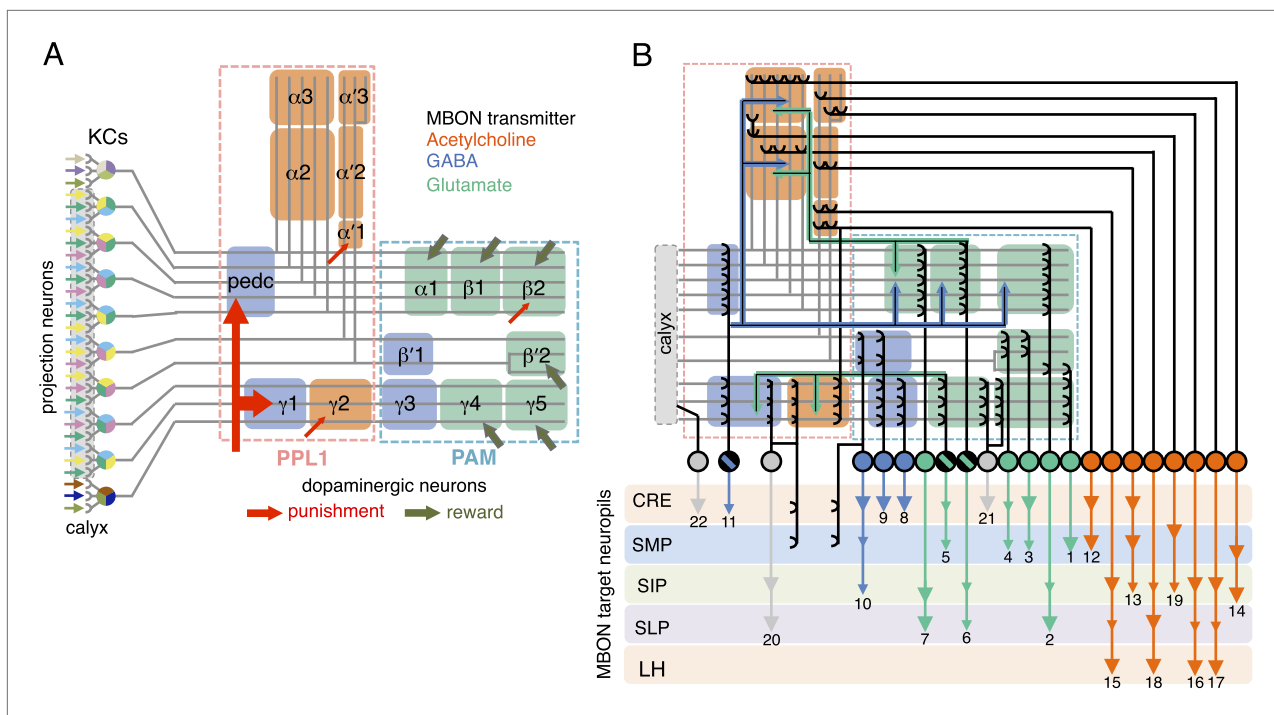


Figure 1. Circuit diagrams of the mushroom body. **(A)** The innervation patterns of extrinsic neurons define 15 compartments in the MB lobes and one compartment in the core of distal pedunculus (pedc); the compartments are represented by rectangles that are color-coded based on the neurotransmitter used by the mushroom body output neurons (MBONs) having dendrites in that compartment (green, glutamate; blue, GABA; orange, acetylcholine). Projection neurons (far left, colored arrows) from the antennal lobe convey olfactory sensory information to the MB calyx where they synapse on the dendrites of Kenyon cells (KCs). The parallel axon fibers of the KCs (gray lines) form the lobes (α/β , α'/β' and γ) where KCs terminate onto the dendrites of the MBONs. Each of the seven types of KCs innervates a specific layer within a given lobe. The dendrites of individual MBON types and the terminals of dopaminergic neurons (DANs) intersect the longitudinal axis of KC axon-bundles in specific compartments along the lobes. MBONs using the same transmitter are spatially co-localized in the lobes (See **Figure 1B**). Innervation areas of PPL1 and PAM cluster DANs axons in the MB lobes are indicated by the rectangles outlined in dashed lines. Activation of subsets of DANs can convey punishment or reward, respectively inducing aversive or appetitive memory when activation is paired with odor presentation. The size of arrows indicates magnitude of memory induced by DAN activation. See text for references. **(B)** Schematic representation of the 21 cell types of MBONs in the lobes and one cell type of MBON in the calyx based on the data presented in the accompanying manuscript (**Aso et al., 2014**): circles, cell bodies; semicircles, dendrites; arrowheads, axon terminals; color-coding is by neurotransmitter as in panel **(A)** Three MBON cell-types (GABAergic MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β , glutamatergic MBON- $\gamma 4$ > $\gamma 1\gamma 2$ and MBON- $\beta 1$ > α ; marked as 11, 5 and 6 respectively) send axons into the MB lobes. Axons of MBON- $\gamma 4$ > $\gamma 1\gamma 2$ project from $\gamma 4$ to $\gamma 1$ and $\gamma 2$, and thus have the potential to affect activity of MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β . From $\gamma 1$, the axon of MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β projects to compartments in the α/β lobes including $\beta 1$, where dendrites of MBON- $\beta 1$ > α arborize. Axons of both MBON- $\gamma 1$ pedc> α/β and MBON- $\beta 1$ > α project to the compartments in the α lobe. Therefore activity of MBONs in the α lobe can be regulated by these layered inter-compartmental connections. These three types of MBONs (11, 5 and 6) do not project back to their own dendrites. Therefore, the organization of the MBONs can be viewed as forming a multilayered feed-forward network (**Aso et al., 2014**). MBONs project to a small number of brain areas: the crepine (CRE; a region surrounding the horizontal/medial lobes), the superior medial protocerebrum (SMP), superior intermediate protocerebrum (SIP) and superior lateral protocerebrum (SLP) and the lateral horn (LH). The size of the arrowhead reflects the relative number of termini in each area. The MBONs are numbered and listed in **Table 1**. See the accompanying manuscript (**Aso et al., 2014**) and **Table 1** for details.

DOI: 10.7554/eLife.04580.003

cyclase encoded by the *rutabaga* gene, are required specifically in the KCs for memory formation (**Livingstone et al., 1984; Zars et al., 2000; Schwaerzel et al., 2003; Kim et al., 2007; McGuire et al., 2003; Gervasi et al., 2010; Qin et al., 2012**) and *rutabaga* was shown to be required for the establishment of the differences in MBON odor tuning between individuals (Hige et al., unpublished). Reward and punishment recruit distinct sets of dopaminergic neurons (DANs) that project to specific regions in the MB lobes (**Mao and Davis, 2009; Burke et al., 2012; Liu et al., 2012**). Moreover, exogenous activation of these DANs can substitute for reinforcing stimuli to induce either appetitive or aversive memory, depending on DAN cell type (**Figure 1A**) (**Yamagata et al., in press; Perisse et al., 2013; Schroll et al., 2006; Claridge-Chang et al., 2009; Aso et al., 2010, 2012; Liu et al., 2012; Burke et al., 2012**). In sum, while the identity of the learned odor is likely encoded by the small subset of KCs activated by that odor, whether dopamine-mediated modulation assigns positive or negative

Table 1. The list of MBON cell types

cell type name	cell body cluster	putative transmitter	Number of cells	short names (number in <i>Figure 1B</i>)	names in previous publications
MBON- $\gamma 5\beta'2a$	M4/M6 cluster	glutamate	1	MBON-01	MB-M6
MBON- $\beta 2\beta'2a$			1	MBON-02	
MBON- $\beta'2mp$			1	MBON-03	MB-M4
MBON- $\beta'2mp_{bilateral}$			1	MBON-04	MB-M4?
MBON- $\gamma 4 > \gamma 1 \gamma 2$	MV2 cluster		1	MBON-05	
MBON- $\beta 1 > \alpha$			1	MBON-06	MB-MV2
MBON- $\alpha 1$			2	MBON-07	
MBON- $\gamma 3$	$\gamma 3$ cluster	GABA	1	MBON-08	
MBON- $\gamma 3\beta'1$			1	MBON-09	
MBON- $\beta'1$			8	MBON-10	
MBON- $\gamma 1 pedc > \alpha/\beta$			1	MBON-11	MB-MVP2
MBON- $\gamma 2\alpha'1$	V3/V4 cluster	acetylcholine	2	MBON-12	
MBON- $\alpha'2$			1	MBON-13	MB-V4
MBON- $\alpha 3$			2	MBON-14	MB-V3
MBON- $\alpha'1$	V2 cluster		2	MBON-15	
MBON- $\alpha'3ap$			1	MBON-16	MB-V2 α'
MBON- $\alpha'3m$			2	MBON-17	MB-V2 α'
MBON- $\alpha 2sc$			1	MBON-18	MB-V2 α
MBON- $\alpha 2p3p$			2	MBON-19	
MBON- $\gamma 1 \gamma 2$		N.D.	1	MBON-20	
MBON- $\gamma 4 \gamma 5$			1	MBON-21	
MBON-calyx			1	MBON-22	MB-CP1

The name of each cell type is given. For MBONs, we use MBON plus the name of MB lobe compartment(s) in which their dendrites arborize (for example, MBON- $\alpha 1$ for the MB output neurons that have dendrites in the $\alpha 1$ compartment; MBON- $\gamma 5\beta'2a$ for the MB output neurons that have dendrites in the $\gamma 5$ compartment and the anterior layer of the $\beta'2$ compartment). For the three classes of MBONs which also have axon terminals in the MB lobes, the '>' symbol is followed by the compartments (or lobes) in which the axons terminate (for example, MBON- $\beta 1 > \alpha$ for the MB output neuron with dendrites in $\beta 1$ and synaptic terminals in the α lobe.). Subsets of MBONs have their cell bodies clustered, presumably reflecting their common developmental origin; these clusters are indicated. The neurotransmitter used by each MBON (where known) is indicated as is the number of cells of that type found per brain hemisphere (data from the accompanying manuscript; (Aso et al., 2014). We also provide a short cell type name based on simple numbering; the number of an MBON corresponds to number shown in *Figure 1B*. Many of these cell types have been previous described under alternative names, as indicated (Tanaka et al., 2008).

DOI: [10.7554/eLife.04580.004](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.004)

valence to that odor would be determined by where in the MB lobes KC-MBON synapses are modulated and thus which MBON cell types alter their response to the learned odor.

Combining the above observations with our comprehensive anatomical characterization of MB inputs and outputs (Aso et al., 2014) lays the groundwork for testing models of how the MB functions as a whole. We suggest that each of the 15 MB compartments—regions along the MB lobes defined by the arborization patterns of MBONs and DANs (see *Figure 1*)—functions as an elemental valuation system that receives reward or punishment signals and translates the pattern of KC activity to a MBON output that serves to bias behavior by altering either attraction or aversion. This view implies that multiple independent valuation modules for positive or negative experiences coexist in the MB lobes, raising the question of how the outputs across all the modules are integrated to result in a coherent, adaptive biasing of behavior.

Although several MBON cell types have been shown to play a role in associative odor memory (*Sejourné et al., 2011; Pai et al., 2013; Placais et al., 2013*), the functions of most MBONs have not been studied. Based on our anatomical analyses (*Aso et al., 2014*), we believe that just 34 MBONs of 21 types provide the sole output pathways from the MB lobes. To gain mechanistic insight into how the ensemble of MBONs biases behavior, we would first like to know the nature of the information conveyed by individual MBONs and the extent to which their functions are specialized or segregated into different information channels. Then we need to discover how the activities of individual MBONs contribute to influence the behavior exerted by the complete population of MBONs. Thus, in order to understand how memory is translated into changes in behavior, we need to have experimental access to a comprehensive set of MBONs and investigate how the outputs from different MBONs bias behavior, singly and in combination.

In the accompanying paper (*Aso et al., 2014*), we describe the detailed anatomy of the DANs and MBONs (*Figure 1*) and the generation of intersectional split-GAL4 driver lines to facilitate their study. All but one of the 21 MBON cell types consists of only one or two cells per hemisphere (*Table 1*). Dendrites of MBONs that use the same neurotransmitter—GABA, glutamate or acetylcholine—are spatially clustered in the MB lobes. Intriguingly, this spatial clustering resembles the innervation patterns of modulatory input by two clusters of dopaminergic neurons, PPL1 and PAM. MBONs have their axonal terminals in a small number of brain regions, but their projection patterns also suggest pathways for relaying signals between compartments of the MB lobes; three MBONs send direct projections to the MB lobes and several other MBONs appear to target the dendrites of specific DANs.

Our split-GAL4 drivers give us the capability to express genetically encoded effectors in identified MBONs to modify their function. In this study, we examine the roles of specific MBONs in various learning and memory tasks as well as in the regulation of locomotion and sleep. We also studied whether direct activation of specific MBONs are sufficient to elicit approach or avoidance. Our results indicate that the ensemble of MBONs does not directly specify particular motor patterns. Instead, MBONs collectively bias behavior by conveying the valence of learned sensory stimuli, irrespective of the modality of the stimulus or the specific reward or punishment used during conditioning.

Results

Strategy for assigning behavioral roles to MBONs

A powerful strategy to discover if a neuronal population plays a role in a particular behavior is to observe the effects of inactivating or activating those neurons. A genetic driver can be used to express an exogenous protein that either promotes or blocks neuronal activity. By repeating such manipulations with a large collection of drivers, each specific for a different set of neurons, one can in principle discover cell types required for a particular behavior. This is analogous to a screen to identify genes that when mutated disrupt a cellular function, but it is the activity of cells—rather than that of genes—being altered. This approach has been widely used in *Drosophila* (Reviewed in *Venken et al., 2011; Griffith, 2012*).

There are many challenges in carrying out such an approach. As in all biological systems, we expect extensive resiliency to perturbation. Such robustness might mask the effects of manipulating the activity of a small population of neurons, making them undetectable above the normal variation between animals. In addition to these inherent limitations, the genetic tools at our disposal have often been inadequate. In this study, we have used improved genetic tools and employed several strategies to mitigate their remaining limitations, as detailed below and in 'Materials and methods'. By assaying many different behaviors with the same genetic reagents, we were better able to evaluate the specificity of the behavioral effects we observed. Our experimental design placed an emphasis on avoiding false positives. Extensive analysis was restricted to MBON lines showing a phenotype in the initial screens and our scoring criteria were conservative. Consequently, we are likely to have missed detecting some cell types with effects on the behavior under assay.

Photoactivation of MBONs can drive either approach or avoidance

We sought to first determine the nature of the information conveyed by MBONs. In the most widely used olfactory conditioning assay, memory is assessed after training by allowing flies to distribute between two arms of a T-maze: one arm perfused with a control odor and the other arm with an odor

that had been previously associated with punishment or reward. If the valence of the learned odor were encoded by the altered activities of specific MBONs, artificial activation of those MBONs in untrained flies in the absence of odor presentation would be expected to result in avoidance or approach behavior that mimicked the conditioned odor response. To test this hypothesis, we used a circular arena in which groups of flies expressing the red-shifted channelrhodopsin CsChrimson (*Klapoetke et al., 2014*) in MBONs were allowed to freely distribute between dark quadrants and quadrants with activating red light (**Figure 2A**; see ‘Materials and methods’ for details). Activating sensory neurons for CO₂ or bitter taste in this manner induced strong avoidance (**Figure 2B**), consistent with previous reports (*Suh et al., 2007*). By testing our collection of MBON split-GAL4 drivers in this assay, we found cell types whose activation resulted in avoidance of the red light and others whose activation led to attraction (**Figure 2C**). Behavioral valence was highly correlated with MBON transmitter type: all MBONs eliciting aversion were glutamatergic and all the MBONs eliciting attraction were either GABAergic or cholinergic. We selected two split-GAL4 drivers for each neurotransmitter type for further analysis, choosing lines that gave robust phenotypes in the initial screening and that showed highly specific expression patterns based on direct assessment of CsChrimson expression (**Figure 3A–F**). The phenotypes of these lines were reproducible (**Figure 3G–I**) and none of the drivers

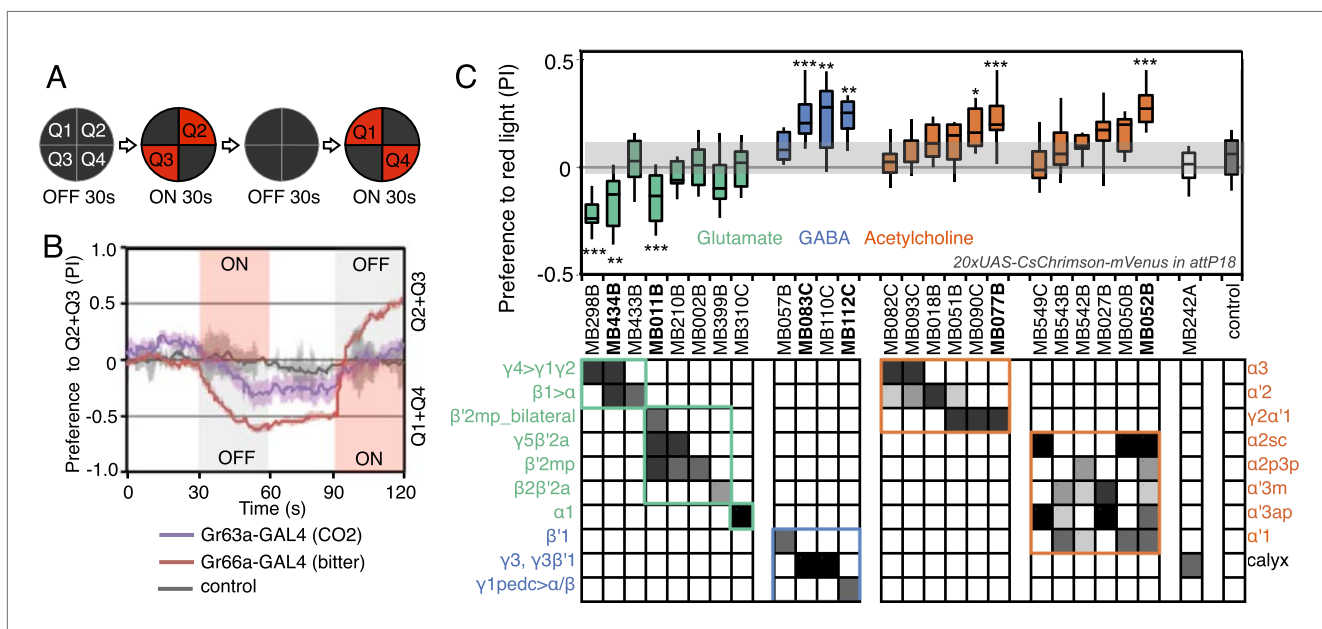


Figure 2. Screening MBONs for behavioral valence. **(A)** Behavioral valence assay. Approximately twenty female flies were placed in a 10 cm circular arena in a dark chamber and allowed to distribute themselves freely among the four quadrants. From 30–60 s, two of the quadrants (Q2&3) were illuminated with 617 nm peaked red LED lights to activate CsChrimson-containing neurons; from 90–120 s, the other two quadrants (Q1 & 4) were illuminated instead. No quadrants were illuminated from 0–30 s or from 60–90 s. The flies were video recorded and their locations in the arena were used to calculate behavioral preferences. **(B)** For these time-domain plots, the quadrant preference at each point in time was calculated as [(number of flies in Q2&3) - (number of flies in Q1&4)]/(total number of flies). Flies expressing CsChrimson in receptor neurons for CO₂ or for bitter taste (using the indicated drivers and *20xUAS-CsChrimson-mVenus in attP18*) avoided the illuminated quadrants, whereas the control genotype (empty driver, *pBDPGAL4U* in *attP2/20xUAS-CsChrimson-mVenus in attP18*) showed a very slight preference for illuminated quadrants. Lighter colored areas around lines indicate the standard error of the mean. **(C)** Screening of MBON drivers for behavioral valence. The red-light preference index (PI) was defined as: [(number of flies in illuminated quadrants) - (number of flies in non-illuminated quadrants)]/(total number of flies). For each 2-min experiment, the overall PI was calculated by averaging the PIs from the final 5 s of each of the two red-lights-on conditions (namely, 55–60 s and 115–120 s). MBON cell types expressed in each driver are shown in the matrix below the graph; collectively all the drivers covered 20 of the 22 MBON types. MBON- γ 3 and MBON- γ 3 β 1 are listed together, because these MBON cell types are always labeled together in our split-GAL4 lines. Driver lines shown in bold were selected for more detailed experiments. MBONs have been grouped by cell body cluster, neurotransmitter and color-coded as indicated (see **Table 1**). The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Relative expression levels in individual cell types were estimated by confocal microscopy of brains stained for CsChrimson-mVenus and are shown in gray scale (See ‘Materials and methods’; **Figure 3** and **Figure 3—figure supplements 1,2** show confocal images). Statistical tests are described in methods: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; $n = 11–29$ for GAL4/CsChrimson; $n = 67$ for control.

DOI: 10.7554/eLife.04580.005

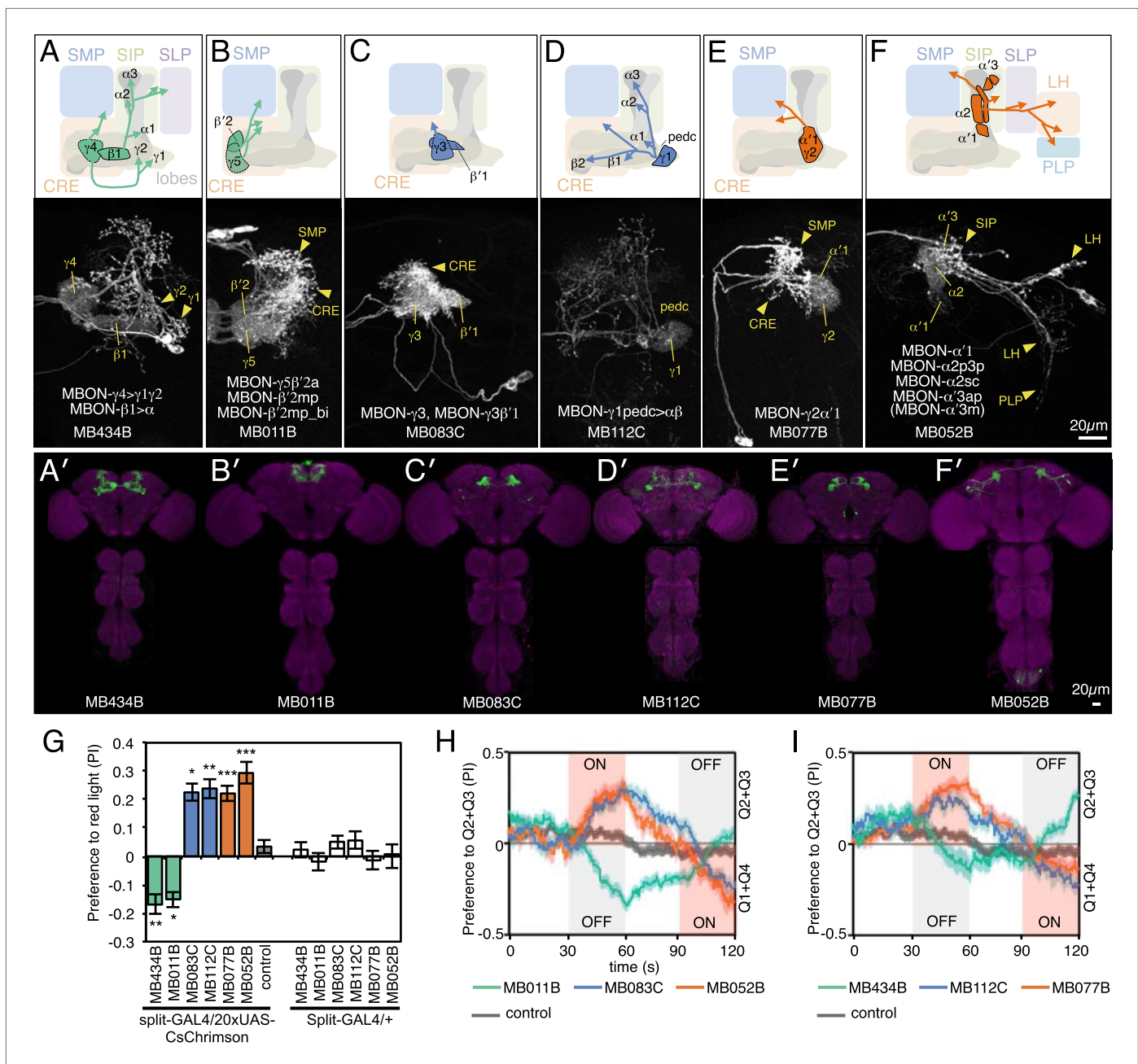


Figure 3. MBONs for attraction and repulsion. (A–F) Anatomy of MBONs in six selected drivers. Top: Diagrams of the cell types that show expression with each driver, color-coded by neurotransmitter. The name of the split-GAL4 driver line and the cell type(s) in which it expresses are given at the bottom of each panel. The positions of their dendrites in the MB lobes are indicated; the arrows show the projections of their axons. Bottom: Confocal images of a single brain hemisphere for each line; MB compartments occupied by the dendrites of the MBONs in each line are labeled and the arrowheads indicate the sites of their synaptic terminals. See **Figure 1** legend for abbreviations. Full confocal stacks of these images are available at www.janelia.org/split-gal4. (A'–F') Expression patterns of the same drivers shown in a complete brain and ventral nerve cord: green, expression of CsChrimson; magenta, neuropil reference stain (nc82 antibody). Frontal views of maximum intensity projections are shown. See the accompanying manuscript (Aso et al., 2014) for a detailed description of the morphology of each cell type. (G) The preference index (PI) for each experimental group (split-GAL4/CsChrimson) was compared with split-GAL4/+ and *pBDPGAL4U/CsChrimson* controls. Bars and error bars indicate mean and standard error of the mean respectively. Asterisk indicates significance: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (H–I) Time course of the preference index. See legend to **Figure 2** for more explanation. Data for six drivers and control are displayed in two panels for clarity, color-coded as indicated.

DOI: 10.7554/eLife.04580.006

Figure 3. Continued on next page

Figure 3. Continued

The following figure supplements are available for figure 3:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s with UAS-CsChrimson.

DOI: [10.7554/eLife.04580.007](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.007)

Figure supplement 2. Expression patterns of split-GAL4s with UAS-CsChrimson.

DOI: [10.7554/eLife.04580.008](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.008)

showed significant preference to the red light in the absence of the CsChrimson effector (**Figure 3G**), confirming that phototaxis was limited at the wavelength and intensity of light used. These results demonstrate that activation of MBONs is itself sufficient to elicit either approach or avoidance, depending on the cell type.

Although activation of individual cell types (see **Figure 3D,E**) can result in robust phenotypes, some of the strongest effects were observed with drivers that express in combinations of MBONs. For example, MB011B and MB052B, which drive expression in groups of three or five cell types that use the same transmitter (the glutamatergic M4/M6 and cholinergic V2 clusters, respectively; **Table 1**), caused strong responses, while activation with drivers for smaller subsets or individual cell types within these groups had much reduced effects (**Figure 2C**). Although activation of the single cell types MBON- $\gamma 1pedc > \alpha/\beta$ or MBON- $\gamma 4 > \gamma 1\gamma 2$ had a significant effect, these neurons send axonal projections to other compartments in the MB lobes, giving them the potential to directly influence the activity of additional MBON cell types. Given that multiple MBONs can independently contribute to behavioral valence as measured by attraction vs repulsion, we sought to determine how conflicting or consonant information from multiple MBONs is integrated to bias behavior. We combined two split-GAL4 drivers for cell types with either similar or opposite effects in the same fly (**Figure 4, Figure 4—figure supplement 1**; 'Materials and methods'). When combining drivers eliciting similar responses, flies generally showed a stronger response than to either driver alone. Conversely, co-activation of MBON cell types with opposing effects resulted in intermediate responses. Together, these data are consistent with a simple combinatorial model of valence integration.

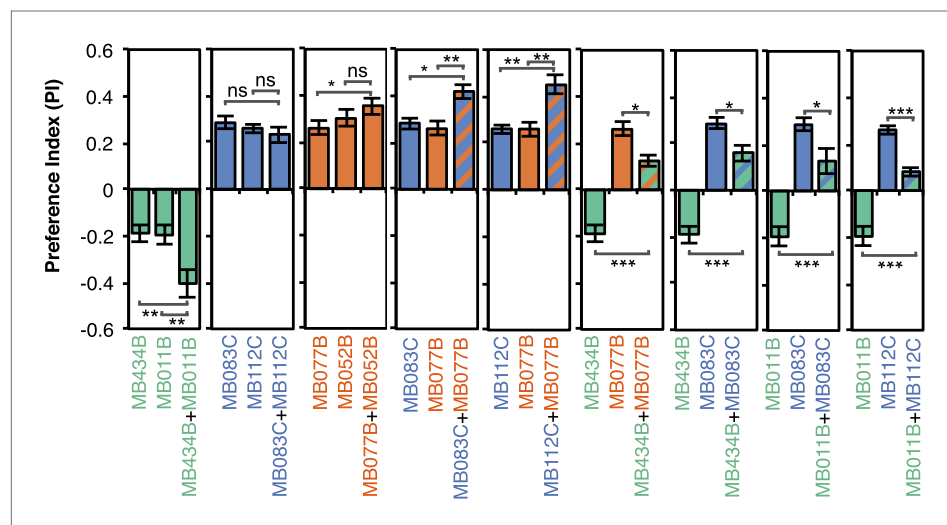


Figure 4. Additive effects of MBONs for attraction and repulsion. PIs of individual drivers and combinations of drivers are shown when tested by the protocol shown in **Figure 2A**. The expression patterns of the combination drivers are shown in **Figure 4—figure supplement 1**. Bar graphs are color coded by the transmitter of the MBONs. To facilitate comparisons, data for some genotypes are shown in more than one panel. Asterisk indicates significance: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

DOI: [10.7554/eLife.04580.009](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.009)

The following figure supplement is available for figure 4:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4 combinations.

DOI: [10.7554/eLife.04580.010](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.010)

How do MBONs bias behavior to cause approach or avoidance? A conditioned response to a learned odor is unlikely to be achieved by eliciting a predetermined motor pattern. To carry out appropriate changes in speed and direction, a fly needs to evaluate both the valence of the learned odor and its own trajectory relative to the location of the odor source. To assess which aspects of locomotion are modified by MBON activation to generate a bias between approach and avoidance, we analyzed the behavior of flies in a 10 mm-wide graded lighting choice zone centered on the border between dark and illuminated quadrants. We tracked the trajectories of individual flies (**Figure 5A–C**) and calculated the fraction of flies crossing the choice zone from the ‘light-off’ to the ‘light-on’ area (and vice versa) as well as the fraction of flies changing direction in the choice zone thus returning to the area they came from.

Most control flies entering the choice zone from either the light-off or light-on side continued moving forward, crossing into the other side (**Figure 5D,E; Video 1**). Flies expressing C_sChrimson in either GABAergic (MB112C or MB083) or cholinergic (MB077B or MB052B) MBONs behaved similarly to control flies when entering the choice zone from the light-off area. When they entered from the light-on side, these flies showed a slight tendency to turn around in the choice zone (**Figure 5D**) consistent with their preference for illuminated areas (**Figure 2C**). Flies expressing C_sChrimson in a combination of GABAergic and cholinergic MBONs (MB112C plus MB077B), which displayed the strongest preference for lighted areas (**Figure 4**), also showed the highest rates of exiting to the light-on side when entering the choice zone from the light-off area (**Figure 5D**). On the other hand, flies expressing C_sChrimson in glutamatergic MBONs (MB434B, MB011B or a combination of them) frequently turned around in the choice zone when entering from the light-off side while crossing into the light-off area when entering the choice zone from the illuminated side (**Figure 5D,E; Video 2 and Video 3**), behaviors that are consistent with these flies’ avoidance of illuminated areas (**Figure 2C**).

We next calculated the fraction of flies exiting the choice zone into the light-on side irrespective of its entry direction and found this ‘choice probability’ to be highly correlated with preference index (**Figure 5F**). In contrast, we found little correlation between preference index and either mean walking speed or mean angular velocity, an indicator of turning probability, of flies in illuminated quadrants (**Figure 5G,H**). Flies are able to adjust these parameters to execute avoidance behaviors in other contexts; we found that activation of some chemosensory neurons and projection neuron combinations that repelled flies significantly altered both walking and angular speed (**Figure 5—figure supplement 1; Video 4 and Video 5**). Our results indicate that MBON activity biases the direction that flies turn in the choice zone, thereby biasing the direction in which they exit that zone. We did not observe a stereotyped turning behavior in the choice zones; more specifically, the time between entering the choice zone and making a turn as well as the precise direction of the turn varied (**Figure 5E; Videos 2 and 3**). Moreover, flies displayed apparently normal behavior within the uniform illumination of lighted quadrants (**Video 2 and 3**), showing no apparent increase in their speed and turning rates. These observations support the view that MBONs represent valence, abstract information that serves to bias—rather than direct—specific motor patterns.

Requirement of MBONs in two-hour odor-shock and odor-sugar associative memory

We asked which MBONs were required for aversive and appetitive odor memory, using a well-established discriminative olfactory learning paradigm (**Figure 6A**) (**Tempel et al., 1983; Tully and Quinn, 1985; Schwaerzel et al., 2003; Gerber et al., 2004; Davis, 2005**). In this paradigm, flies are exposed to an odor together with an unconditioned stimulus (US) of either an electric shock punishment or a sugar reward, and then to another odor without the US. The ‘trained’ flies are tested at a later time to determine if they exhibit a differential response to the two odors, which is taken as indication of memory formation.

In the first set of experiments we assayed memory 2 hr after training, using a set of 23 split-GAL4 lines to transiently block neuronal activity in different subsets of MBON cell types. Two memory processes that are thought to rely on different molecular and circuit mechanisms, anesthesia resistant memory and anesthesia sensitive memory, contribute to memory at this retention time (**Dudai et al., 1976; Folkers et al., 1993; Isabel et al., 2004; Krashes and Waddell, 2008; Aso et al., 2010; Pitman et al., 2011; Knapek et al., 2011**). We blocked neuronal function throughout the training, retention and test periods. Thus we expect to detect impairments in any phase of memory processing, including formation, consolidation and retrieval.

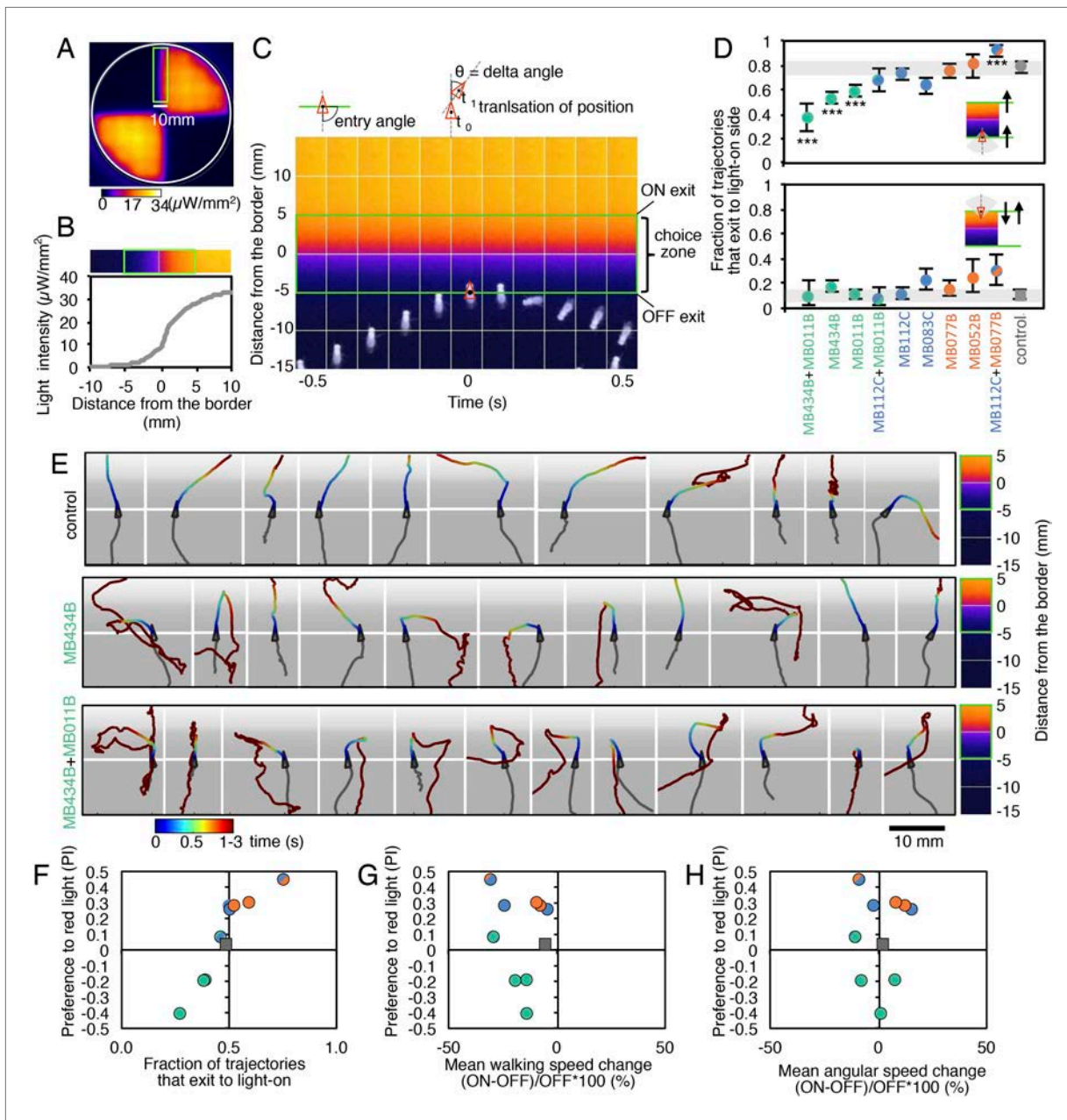


Figure 5. MBONs bias choice at the border. **(A)** Pseudo-colored light intensity in the behavioral arena. The choice zone was defined as ± 5 mm from the light ON/OFF border (green box). **(B)** Gradient of light intensity across the light ON/OFF border axis shown. **(C)** An example of MB434B + MB011B/UAS-CsChrimson fly that entered the choice zone from the light-off side at time = 0 and then stopped and quickly turned around to exit the choice zone, going back into the light-off side. Eleven images taken at 0.1 s intervals have been superimposed. Entry angle to the choice zone was defined as diagramed (top left). Speed and angular speed was calculated based on the difference in the position of a fly in successive frames of 30 frames per second video recordings. **(D)** The fraction of trajectories entering the choice zone from the dark side and then exiting to the illuminated side is plotted for the indicated drivers in combination with CsChrimson (top). The control genotype was the empty driver, *pBDPGAL4U*, in *atpP2* in combination with *20xUAS-CsChrimson-mVenus in atpP18*. Only flies that entered the choice zone at an entry angle of between 45 and 135° (facing to the light ON/OFF border) and had moved more than 5 mm in the 1 s prior to entering the choice zone were analyzed. The error bars show the 95% confidence interval. Between 79 and 410 trajectories were analyzed per genotype. Compared to the control, MB434B + MB011B, MB434B and MB011B showed a significantly lower fraction of trajectories that exit to the light-on side (more avoidance of light), whereas significantly higher fraction of trajectories of MB112C + MB077B flies exit to the light-on side (more attraction to the light); multiple comparisons with the Dunn-Sidak correction: $***, p < 0.001$. Similarly, the fraction of trajectories entering the choice zone from the illuminated side and then changing direction so as to also exit to the illuminated side is plotted for the indicated drivers in combination with CsChrimson (bottom). Between 43 and 280 trajectories were analyzed per genotype. **(E)** Representative trajectories

Figure 5. Continued on next page

Figure 5. Continued

are shown for the indicated genotypes. The trajectories are color-coded to indicate the position of the fly in the trajectory as a function of time after entering the choice zone. The triangle shows the position of the fly at time = 0, when flies entered into the choice zone (indicated by the white line at -5 mm from the light ON/OFF border). The gray scale background in the panels and pseudo-color scale on the right indicate the intensity of CsChrimson activating light. (F) Preference index to the CsChrimson-activating light (Figure 4) was plotted against the fraction of trajectories that exit from the choice zone to the illuminated side irrespective of side of entry: [(number of trajectories enter to the choice zone from dark side and then exit to illuminated side) + (number of trajectories enter to the choice zone from illuminated side and then exit to illuminated side)] divided by total number of trajectories that entered into the choice zone. They were highly correlated (Spearman's rank-order correlation: Pearson $r = 0.91$; R square = 0.83; $p < 0.001$). Genotypes are the same as in panel D and are shown with same color code. (G) Preference index to the CsChrimson light (Figure 4) was plotted against the mean walking speed change in the illuminated quadrants compared to dark quadrants (see Figure 5—figure supplement 1). There was no significant correlation (Spearman's rank-order correlation: Pearson $r = 0.13$; R square = 0.01; $p = 0.72$). Genotypes are the same as in panel D and are shown with same color code. (H) Preference index to the CsChrimson light (Figure 4) was plotted against mean angular speed in the illuminated quadrants compared to dark quadrants (see Figure 5—figure supplement 1). There was no significant correlation (Spearman's rank-order correlation: Pearson $r = 0.12$; R square = 0.001; $p = 0.75$). Genotypes are the same as in panel D and are shown with same color code.

DOI: 10.7554/eLife.04580.011

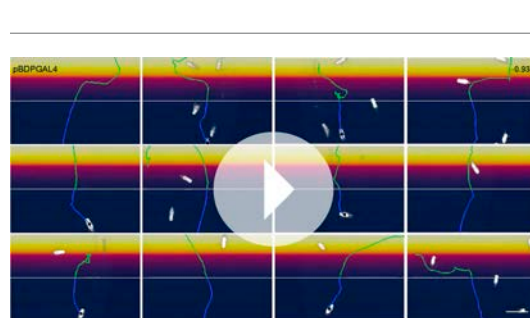
The following figure supplement is available for figure 5:

Figure supplement 1. MBON activation has only small effects on walking and angular speeds.

DOI: 10.7554/eLife.04580.012

We first screened the lines using a strong *Shibire^{ts1}* effector (*pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* in *VK00005*). Because some lines had phenotypes at the permissive temperature, presumably due to the effector's high level of expression, we retested the nine lines that showed a reduction in memory performance with a weaker *Shibire^{ts1}* effector (*UAS-Shi x1*; see Figure 6 legend and 'Materials and methods'). With these parameters, only one line, MB112C, also showed significant memory impairment (Figure 6B). The experimental MB112C flies showed significantly lower memory performance than genetic control groups at the restrictive temperature (Figure 6C), but not at the permissive temperature (Figure 6D). These flies displayed normal shock and odor avoidance at the restrictive temperature (Figure 6E,F), indicating that the observed memory impairment was not due to a defect in sensory or motor pathways. MB112C drives expression in *MBON-γ1pedc>α/β* (Figure 6—figure supplement 1A). We confirmed the requirement for this cell type using a second driver, MB085C, not included in the original 23 lines screened (Figure 6C; Figure 6—figure supplement 1A).

One of the PPL1 cluster dopaminergic neurons, PPL1-γ1pedc (also known as MB-MP1), innervates the same MB compartments as *MBON-γ1pedc>α/β*. Blocking PPL1-γ1pedc activity, using the MB438B split-GAL4 driver, also impaired aversive memory (Figure 6C–F). Conversely, activation of PPL1-γ1pedc with the temperature gated cation channel *dTrpA1* (Hamada et al., 2008) substituted for electric shock as the unconditioned stimulus (US), inducing robust aversive odor memory (Figure 6G). This confirms a conclusion reached using less specific enhancer trap GAL4 drivers (Aso et al., 2010, 2012). Consistent with these observations, restoring expression of the D1-like dopamine receptor

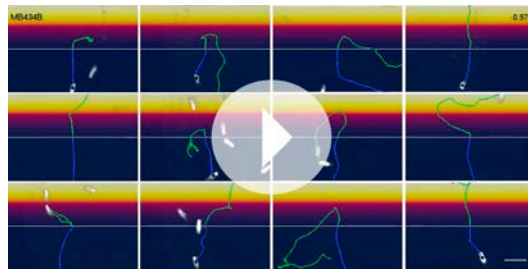


Video 1. Choice behaviors of control flies.

A representative 12 trajectories for the control genotype (*pBDPGAL4U/CsChrimson*) showing flies that entered the choice zone from the light-off side at the 1-s time point and their subsequent behavior for 3 s. See legend of Figure 5E for more explanation. Time is shown in the upper right corner.

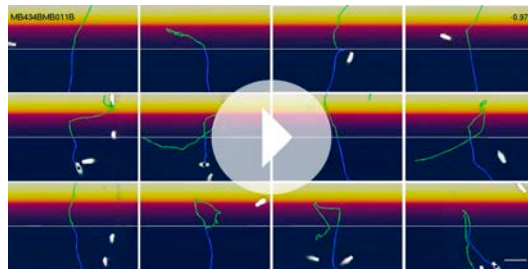
DOI: 10.7554/eLife.04580.013

specifically in the γ Kenyon cells has been shown to rescue the aversive odor memory defect of a receptor mutant (Qin et al., 2012). *MBON-γ1pedc>α/β* is immunoreactive to GABA (Figure 6—figure supplement 1C) and is one of only three MBON cell types with axon terminals within the MB lobes (Figure 6H; Figure 6—figure supplement 1D,E) (Aso et al., 2014). We visualized the single-cell morphologies of *MBON-γ1pedc>α/β* (Figure 6I) and PPL1-γ1pedc (Figure 6J) and using two-color labeling confirmed that the axon terminals of the DAN (one or two cells per brain hemisphere) precisely overlap with the dendrites of the MBON (a single cell per brain hemisphere) in the MB pedunculus and $\gamma 1$ compartment (Figure 6K). This establishes two essential components of a circuit for 2-hr aversive odor memory.



Video 2. Choice behaviors of MB434B/CsChrimson flies. A representative 12 trajectories for MB434B/CsChrimson flies showing flies that entered the choice zone from the light-off side at the 1-s time point and their subsequent behavior for 3 s. When two glutamatergic MBONs (MBON- $\gamma 4 > \gamma 1 \gamma 2$ and MBON- $\beta 1 > \alpha$) were activated using MB434B/CsChrimson, flies tended to avoid entering light-on quadrants. The motor patterns they used for avoiding the light-on quadrants were not stereotyped, as illustrated by the randomly selected examples shown in this video.

DOI: [10.7554/eLife.04580.014](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.014)



Video 3. Choice behaviors of MB434B + MB011B/CsChrimson flies. A representative 12 trajectories for MB434B + MB011B/CsChrimson flies showing flies that entered the choice zone from the light-off side at the 1-s time point and their subsequent behavior for 3 s. When five glutamatergic MBONs (MBON- $\gamma 4 > \gamma 1 \gamma 2$, MBON- $\beta 1 > \alpha$, MBON- $\gamma 5 \beta' 2a$, MBON- $\beta' 2mp$ and MBON- $\beta' 2mp_{bilateral}$) were activated using MB434B + MB011B/CsChrimson, the avoidance response is observed in a slightly higher fraction of flies than in **Video 2**.

DOI: [10.7554/eLife.04580.015](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.015)

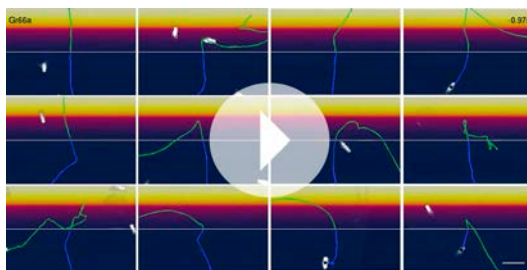
are trained to associate a color (blue or green) with either an electric shock punishment or a sugar reward (**Figure 8A** and **Figure 9A**), **Vogt et al., 2014** demonstrated that γ -lobe KCs are required for immediate visual associative memory and that activation of specific subsets of PPL1 and PAM cluster DANs can substitute as the US for electric shock or sugar, respectively. Here we use the same assays to ask which MBONs are required for visual memory. We used the strong *Shi^{ts}* effector (*pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10 in VK00005*) to silence MBONs (Materials and methods).

For aversive visual memory (**Figure 8B**), we identified one driver line, MB112C, that labels MBON- $\gamma 1pedc > \alpha/\beta$. We confirmed the requirement for this cell type with two additional split-GAL4 lines, MB262B (**Figure 8C**; **Figure 8—figure supplement 1**) and MB085C (data not shown). This is the same MBON we found to be important for olfactory aversive memory (**Figure 6**) and so we asked if the same DAN as in olfactory memory was likewise required. Indeed, we found that MB438B, a driver line for PPL1- $\gamma 1pedc$, showed a significant impairment (**Figure 8C**; **Figure 8—figure supplement 1**).

A larger set of MBONs was involved in 2-hr appetitive olfactory memory (**Figure 7**). Inactivation of the neurons represented in 12 out of the 23 split-GAL4 lines tested showed an effect in the initial screening with the strong *Shibire^{ts1}* effector; when retested with the weaker effector, eight of these lines produced a significant impairment (**Figure 7**, **Figure 7—Figure supplement 1**). All eight lines displayed normal memory at the permissive temperature (**Figure 7C**) and normal attraction to sugar at the restrictive temperature (**Figure 7D**). Five of these lines (MB082C, MB093C, MB018B, MB051B and MB077B) express in subsets of the so-called V3/V4 cluster of cholinergic MBONs (MBON- $\gamma 2\alpha' 1$, MBON- $\alpha' 2$ and MBON- $\alpha 3$; **Table 1**), establishing a role for this group of MBONs in 2-hr appetitive memory. MB310C labels the glutamatergic MBON- $\alpha 1$. MB011B labels three types of M4/M6 cluster glutamatergic MBONs (MBON- $\gamma 5 \beta' 2a$, MBON- $\beta' 2mp$ and MBON- $\beta' 2mp_{bilateral}$; **Table 1**), suggesting a role for one or more of these cell types. Two lines that express in subsets of MB011B cell types, MB210B and MB002B, showed a memory defect in the primary screening but failed to reach statistical significance when retested with the weaker effector. Similarly, we observed that activating CsChrimson with MB011B, but not with MB210B or MB002B, produced a significant aversive effect (see **Figure 2C**). These data are consistent with an additive role of these MBONs on behavior, which is further supported by the anatomical observation that the axon terminals of some of these MBONs converge to the same areas outside the MB (**Figure 7E,F**) (**Aso et al., 2014**).

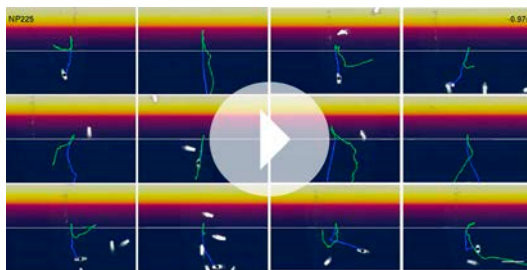
Requirement of the MB output neurons in visual memory

The MB has been proposed to play diverse roles in visual behaviors including context generalization and sensory preconditioning between olfactory and visual cues (**Liu et al., 1999**; **Zhang et al., 2013, 2007**; **Brembs, 2009**; **van Swinderen et al., 2009**). Using visual learning assays in which flies



Video 4. Choice behaviors of Gr66a-GAL4/CsChrimson flies. A representative 12 trajectories for Gr66a-GAL4/CsChrimson flies showing flies that entered the choice zone from the light-off side at the 1-s time point and their subsequent behavior for 3 s. When the Gr66a sensory neurons for bitter taste were activated using Gr66a-GAL4/CsChrimson, flies increased their velocity when they entered the illuminated area, which facilitated their escape from light-on quadrants (see **Figure 2B**).

DOI: [10.7554/eLife.04580.016](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.016)



Video 5. Choice behaviors of NP225-GAL4/CsChrimson flies. A representative 12 trajectories for NP225-GAL4/CsChrimson flies showing flies that entered the choice zone from the light-off side at the 1-s time point and their subsequent behavior for 3 s. When this broad set of antennal lobe projection neurons was activated using NP225-GAL4/CsChrimson, flies showed a stereotyped backward walking behavior when they approached the illuminated area; a response was observed at lower light intensities than with the other driver lines. Flies that were already in the illuminated quadrants when the light turned on showed continuous rotation that typically lasted for entire light-on period (30 s) and often extended a few seconds after the red light was turned off (not shown).

DOI: [10.7554/eLife.04580.017](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.017)

We assessed the requirement of MBONs in the retrieval phase of aversive LTM by training flies at permissive temperature and blocking their activity only during the memory test at 24 hr after training (**Figure 10A**). Inactivation of MB052B, which broadly labels cholinergic V2 cluster MBONs (**Figure 3F; Table 1**), resulted in nearly complete loss of aversive odor LTM recall (**Figure 10C**). Our results confirm a previously reported requirement for the V2 cluster MBONs in long-term aversive odor memory recall (**Sejourné et al., 2011**). We also assayed five lines that express in subsets of the MBONs found in MB052B. While some of them showed lower memory scores, none showed a statistically-significant memory impairment (**Figure 10B**). Therefore, our results suggest that V2 cluster MBONs (**Figure 10D**) function as a group in the retrieval of aversive odor LTM. Consistent

The experimental MB112C, MB262B and MB438B lines showed normal memory at the permissive temperature (**Figure 8C**) and normal shock avoidance at the restrictive temperature (**Figure 8D**). Our finding that the same MBON and its modulatory DAN were required for both visual and olfactory aversive memory suggests that this local MB circuit is important for aversive memory in general, rather than specifically for a particular sensory modality.

For appetitive visual memory, we identified five drivers with significant impairments: MB434B, MB011B, MB210B, MB542B and MB052B (**Figure 9B,C; Figure 9—figure supplement 1**). These lines showed normal memory at the restrictive temperature in the absence of the effector (**Figure 9C**) and at the permissive temperature with the effector (**Figure 9D**), as well as normal sugar attraction at restrictive temperature (**Figure 9E**). The anatomy of the cell types in these driver lines is illustrated in **Figure 9F,G**. Unlike in the case of aversive memory, the cell types required for appetitive memory differed somewhat between visual and olfactory modalities. Nevertheless, these modalities both employed the M4/M6 cluster glutamatergic MBONs labeled in MB011B and MB210B (MBON- $\gamma 5\beta 2a$, MBON- $\beta 2mp$ and MBON- $\beta 2mp_{bilateral}$; **Table 1**). Moreover, the observation that multiple cholinergic and glutamatergic MBONs play a role in appetitive memory, but not aversive memory, was shared across modalities.

Requirement of MBONs in retrieval of long-term odor-shock memory

Repeated pairing of an odor and an electric shock, with inter-trial rest intervals, results in protein synthesis dependent aversive long-term memory (LTM) (**Tully et al., 1994**). The molecular and cellular mechanisms underlying aversive LTM are known to differ from those responsible for memories with shorter retention times (**Yin et al., 1994; Pascual and Preat, 2001; Dubnau et al., 2003; Comas et al., 2004; Isabel et al., 2004; Yu et al., 2006; Blum et al., 2009; Akalal et al., 2010, 2011; Trannoy et al., 2011; Huang et al., 2012; Placais et al., 2012**).

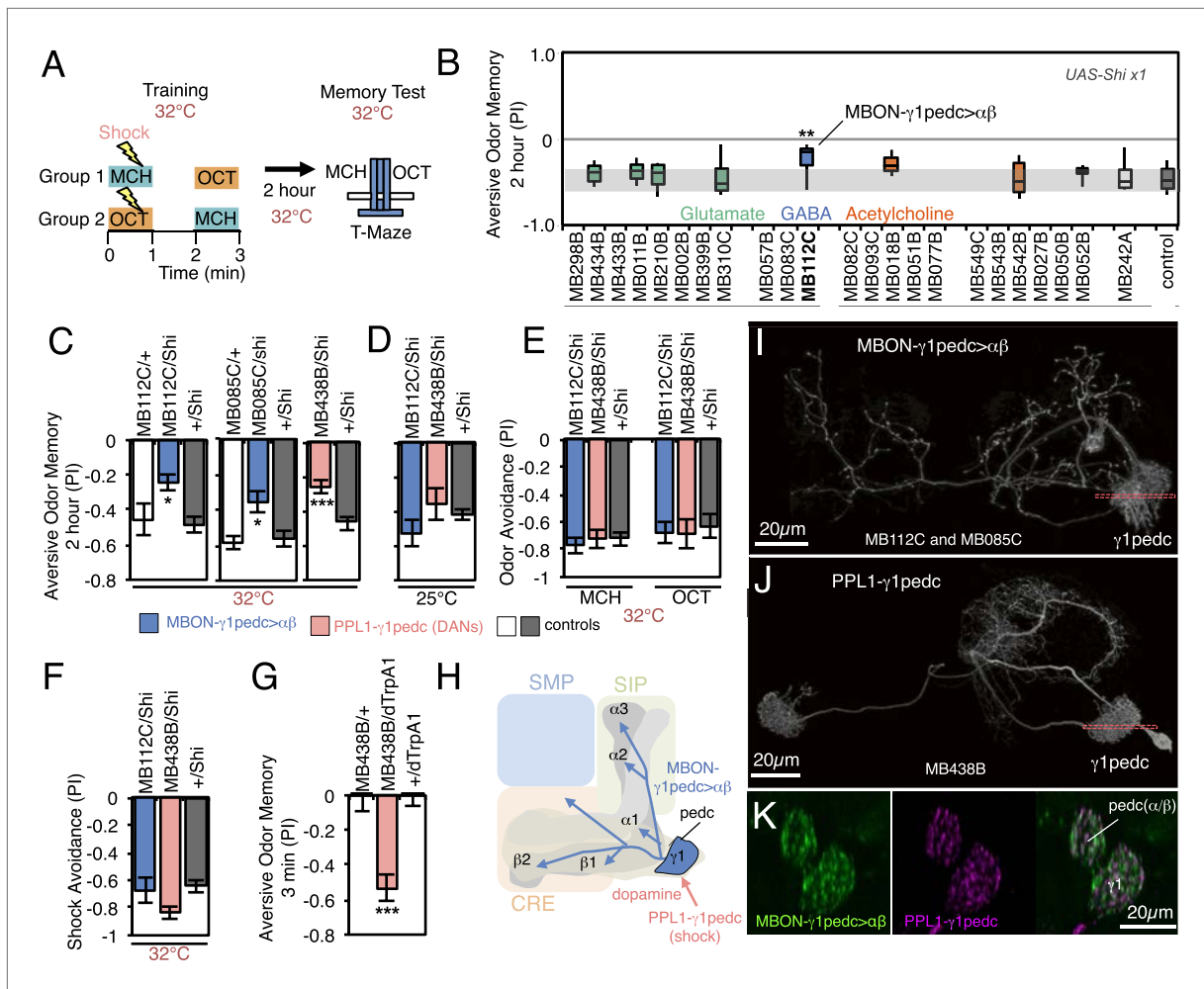


Figure 6. Requirement of MBONs for 2-hr aversive odor memory. **(A)** Schematic of the T-maze apparatus. In one group of flies, 4-methylcyclohexanol (MCH) was paired with electric shocks for 60 s. After a 60 s pause, 3-octanol (OCT) was delivered without electric shock. For the reciprocal group, OCT was paired with electric shock, and MCH was delivered without shock. 2 hr after training, flies were given a choice between the two odors in a T-maze and their distribution was used to calculate a performance index (PI). The PI corresponds to the mean of the [(number of flies in the OCT tube minus number of flies in the MCH tube)/total number of flies when OCT was paired with electric shock] and [(number of flies in the MCH tube minus number of flies in the OCT tube)/total number of flies when MCH was paired with electric shock]. The set of 23 driver lines was first screened using *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10 (VK00005)* as the *Shi^{ts}* effector; lines that showed a strongly decreased PI in this initial screen were retested with the *UAS-Shi x1* effector. **(B)** Results of secondary screening of MBONs for 2-hr aversive memory using *UAS-Shi x1*. MBONs have been grouped by neurotransmitter and color-coded. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: **, *p* < 0.01. **(C)** 2-hr aversive odor memory at the restrictive temperature. In addition to confirming the result obtained with MB112C in the screening assays, a second driver line for MBON- γ 1pedc> α/β , (MB085C) was tested and found to have a similar impairment. Blocking dopaminergic input to the MB compartments where the dendrites of MBON- γ 1pedc> α/β reside, using MB438B, also impairs 2-hr aversive odor memory. *UAS-Shi x1* was used as the effector. See **Figure 6—figure supplement 1** for the expression patterns of the MB112C, MB085C and MB438B drivers. Bars and error bars show mean and standard error of the mean (SEM). Statistical tests are described in methods: *, *p* < 0.05; ***, *p* < 0.001. **(D)** 2-hr aversive odor memory in MB112C/*Shi* and MB438B/*Shi* flies is not impaired at the permissive temperature. *UAS-Shi x1* was used as the effector. **(E)** Avoidance of MCH and OCT in untrained MB112C/*Shi* and MB438B/*Shi* flies is not impaired at the restrictive temperature, indicating that these genotypes can detect and respond to the odors. *UAS-Shi x1* was used as the effector. **(F)** Shock avoidance in untrained MB112C/*Shi* and MB438B/*Shi* flies is not impaired at the restrictive temperature. *UAS-Shi x1* was used as the effector. **(G)** Activation of the PPL1- γ 1pedc dopaminergic neurons can substitute for electric shock as the unconditioned stimulus (US). Flies trained using thermoactivation of MB438B/dTrpA1 as the US showed robust 3 min aversive memory. **(H)** Diagram of a circuit module for aversive odor memory. MBON- γ 1pedc> α/β is shown in blue. PPL1- γ 1pedc conveys the US of electric shock (pink arrow). **(I)** Morphology of MBON- γ 1pedc> α/β . A frontal view of maximum intensity projection of an image of a single cell generated by stochastic labeling using the multicolor flip-out technique (MCFO; Nern et al., in prep.) is shown. MBON- γ 1pedc> α/β has dendrites in γ 1 and the core of pedunculus (pedc), where α/β KCs project. Its axon bilaterally innervates the α/β lobes and the pedc, and neighboring neuropils **Figure 6. Continued on next page**

Figure 6. Continued

(SMP, SIP and CRE); see **Figure 6—figure supplement 1** for more anatomical details. The orange dashed line indicates the plane of the cross section shown in **(K)** of the $\gamma 1$ and the pedc. **(J)** Morphology of PPL1- $\gamma 1$ pedc. A frontal view of maximum intensity projection of an image of a single cell generated by MCFO is shown. PPL1- $\gamma 1$ pedc extends dendrites unilaterally in the SMP, SIP and CRE, and bilaterally innervates the $\gamma 1$ and the pedc. The orange dashed line indicates the plane of the cross section of $\gamma 1$ and the pedc shown in **(K)**. **(K)** Double labeling of MBON- $\gamma 1$ pedc $> \alpha/\beta$ (green; *R12G04-LexA, pJFRC216-13XLexAop2-IVS-myr::smGFP-V5 [su(Hw)attP8]*) and PPL1- $\gamma 1$ pedc (magenta; MB320C, *pJFRC200-10XUAS-IVS-myr::smGFP-HA (attP18)*). A coronal section is shown. The dendrites of MBON- $\gamma 1$ pedc $> \alpha/\beta$ and the terminals of PPL1- $\gamma 1$ pedc precisely overlap in $\gamma 1$ and the pedc.

DOI: [10.7554/eLife.04580.018](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.018)

The following figure supplement is available for figure 6:

Figure supplement 1. Anatomy of MBON- $\gamma 1$ pedc $> \alpha/\beta$ and PPL1- $\gamma 1$ pedc, an MBON-DAN pair essential for aversive memory.

DOI: [10.7554/eLife.04580.019](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.019)

with this implied combinatorial action of V2 cluster MBONs, activating subsets of these MBONs with CsChrimson resulted in weak attraction that only reached statistical significance when MB052B was used as the driver (**Figure 2C**). In calcium imaging experiments, V2 cluster MBONs were reported to reduce their response to an odor that had been learned to be aversive (*Sejourné et al., 2011*); this sign of plasticity is consistent with our observation that activation of these neurons elicited attraction.

Requirement of MBONs in appetitive odor-ethanol intoxication memory

Flies are able to associate an odor with the intoxicating properties of ethanol (**Figure 11A**). Briefly, flies are exposed to two consecutive odors; the second of which is paired with a mildly intoxicating concentration of ethanol vapor. Flies are later tested for their odor preference for the paired vs unpaired odor (**Figure 11A**) (*Kaun et al., 2011*). Flies avoid the odor they experienced at the time of intoxication when tested 30 min after training, but show a long-lasting preference for that odor when tested 24 or more hours later (control data in **Figure 11B,C**) (*Kaun et al., 2011*). Blocking KC synaptic output has been shown to interfere with this memory (*Kaun et al., 2011*), indicating a role for the MB.

To test the role of MBONs in appetitive ethanol memory, we blocked MBON function during training and memory retrieval and assayed for changes in performance. When tested at 24 hr, eight driver lines showed significant memory impairment compared to genetic controls (**Figure 11B,D**; **Figure 11—figure supplement 1**). These eight lines were not significantly different from controls in 30-min aversive memory, although two exhibited a trend towards decreased 30-min memory (**Figure 11C**); the ability to form memories at 30 min establishes that flies of these genotypes can sense the odors and learn to associate them with ethanol.

Our results indicate that MBON- $\gamma 4 > \gamma 1 \gamma 2$ (MB434B and MB298B) and MBON- $\alpha' 2$ (MB018B), whose involvement we confirmed with a second line not part of the original screening set (MB091C; **Figure 11E**), are preferentially required for 24 hr memory.

Our data also suggest the involvement of MBON- $\gamma 2 \alpha' 1$, where one driver line (MB077B) had a strong effect, while the second driver (MB051B) had a weaker effect that did not reach statistical significance (**Figure 11D**). Our results raise the possibility of the involvement of MBON- $\alpha 3$. However, the two lines we have for this cell type (MB082C and MB093C) gave discordant results and MB082C shows significant expression in MBON- $\alpha' 2$, a cell type that has a large effect on appetitive ethanol memory. Finally, blocking M4/M6 cluster MBONs from $\gamma 5$ and $\beta' 2$ (MB011B and MB210B) significantly affected 24 hr memory, but also appeared to decrease 30 min memory. The MBONs required for 24 hr appetitive ethanol memory (**Figure 11F,G**) are partially overlapping with those required for other forms of appetitive memory, again with involvement of multiple glutamatergic and cholinergic MBONs.

Silencing MBON- $\alpha' 2$, a cell type composed of just one cell in each hemisphere (**Figure 11—figure supplement 1F,G**) (*Aso et al., 2014*), resulted in persistence of the aversive memory after 24 hr, when control flies show appetitive memory (see MB018B in **Figure 11D** and MB091C in **Figure 11E**). These results suggest that, while memories for the aversive and rewarding effects of ethanol intoxication are formed simultaneously, they are expressed at different times through independent MB circuits. Moreover, maintenance of the aversive memory upon inactivation of MBON- $\alpha' 2$ argues against a passive dissipation of the aversive memory with time, and implies an active process in the conversion of aversive to appetitive memory.

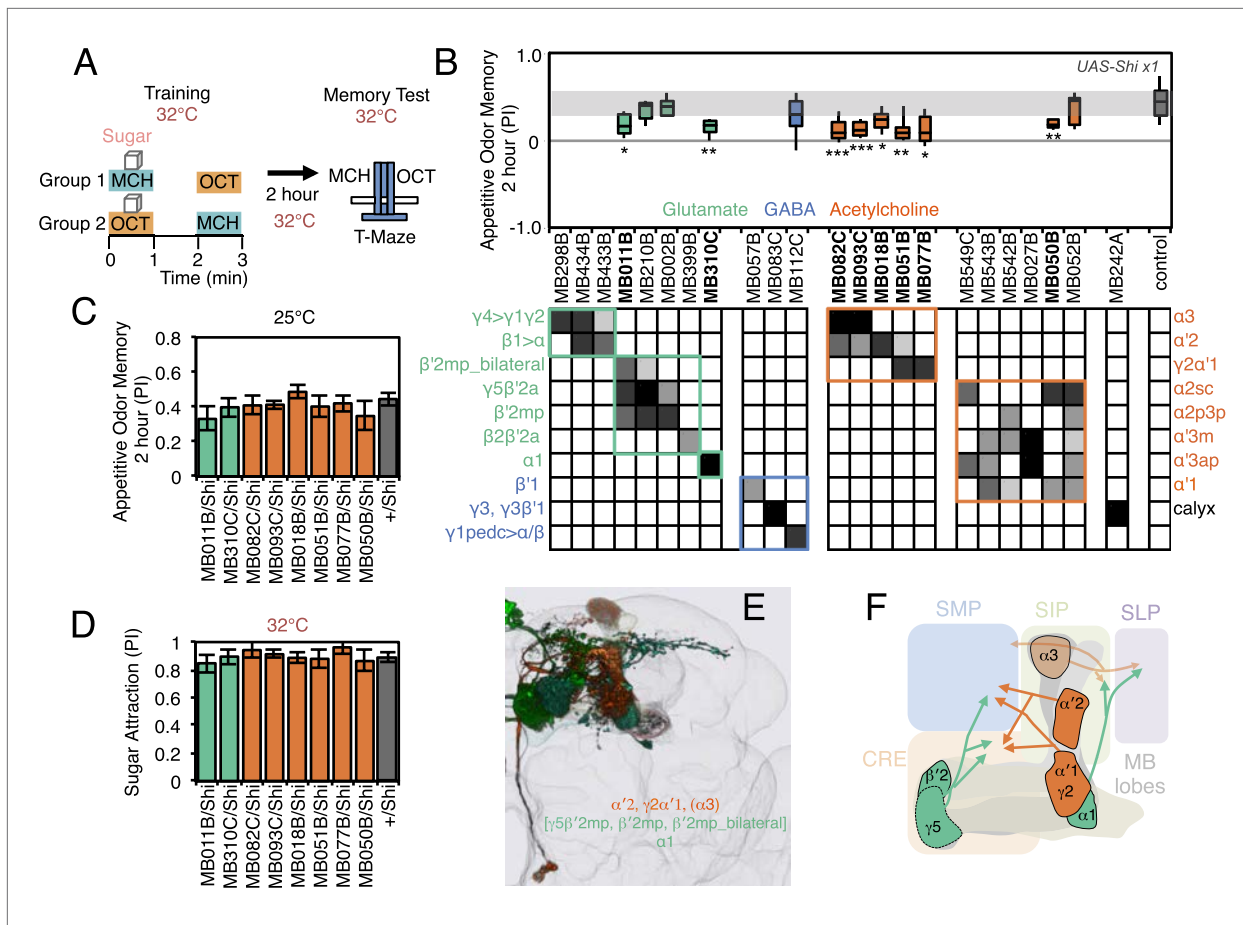


Figure 7. Requirement of MBONs for 2-hr appetitive odor memory. **(A)** Flies were trained and tested in a similar way as in **Figure 6A**, except that flies were starved for 28–40 hr prior to experiments and trained with a reward consisting of a tube covered with sugar absorbed filter paper. **(B)** Results of secondary screening of MBONs for 2-hr appetitive memory using *UAS-Shi x1*. MBONs have been grouped by neurotransmitter and color-coded. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. The relative expression levels produced by the split-GAL4 driver lines in each cell type (indicated by the gray scale) are based on imaging with *pJFRC2-10XUAS-IVS-mCD8::GFP (VK00005)*. Images of the expression patterns of selected drivers are shown in **Figure 7—figure supplement 1**. MB082C and MB093C label the cholinergic MBON- $\alpha 3$; however, these lines also show weak labeling in MBON- $\alpha 2$. As blocking MBON- $\alpha 2$ alone also gave a significant phenotype (MB018B/Shi), we cannot rule out the formal possibility that the phenotype observed with MB082C and MB093C results from blocking MBON- $\alpha 2$. MB050B labels MBON- $\alpha 2$ and MBON- $\alpha 1$; however, because MB052B, which labels the same cell types in addition to others, did not give a phenotype, the requirement for these cell types is not resolved. **(C)** 2 hr appetitive odor memory at permissive temperature. **(D)** Sugar attraction in untrained flies at restrictive temperature. **(E)** Rendering of MBONs with outline of MB lobes and brain. MBONs grouped by square brackets represent cases where the available set of driver lines do not allow assigning an effect to a single cell type, but only to that set of MBONs. MBONs in parentheses represent cases where the data implicating them are only suggestive. **(F)** Diagram of MBONs for appetitive odor memory. MBONs are shown in lighter colors when data implicating them are only suggestive.

DOI: 10.7554/eLife.04580.020

The following figure supplement is available for figure 7:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s that caused appetitive odor memory phenotypes.

DOI: 10.7554/eLife.04580.021

MB output neurons bi-directionally regulate sleep

The involvement of the MB in regulating sleep was first established by demonstrating that blocking synaptic output from KCs can either increase or decrease sleep, depending on the GAL4 driver used (Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006). Sleep in *Drosophila* is under circadian and homeostatic regulation and defined as sustained periods of inactivity (5 min or more) that coincide with increased sensory thresholds, altered brain activity and stereotyped body posture (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000; Hendricks and Sehgal, 2004; Ganguly-Fitzgerald et al., 2006; Parisky et al., 2008;

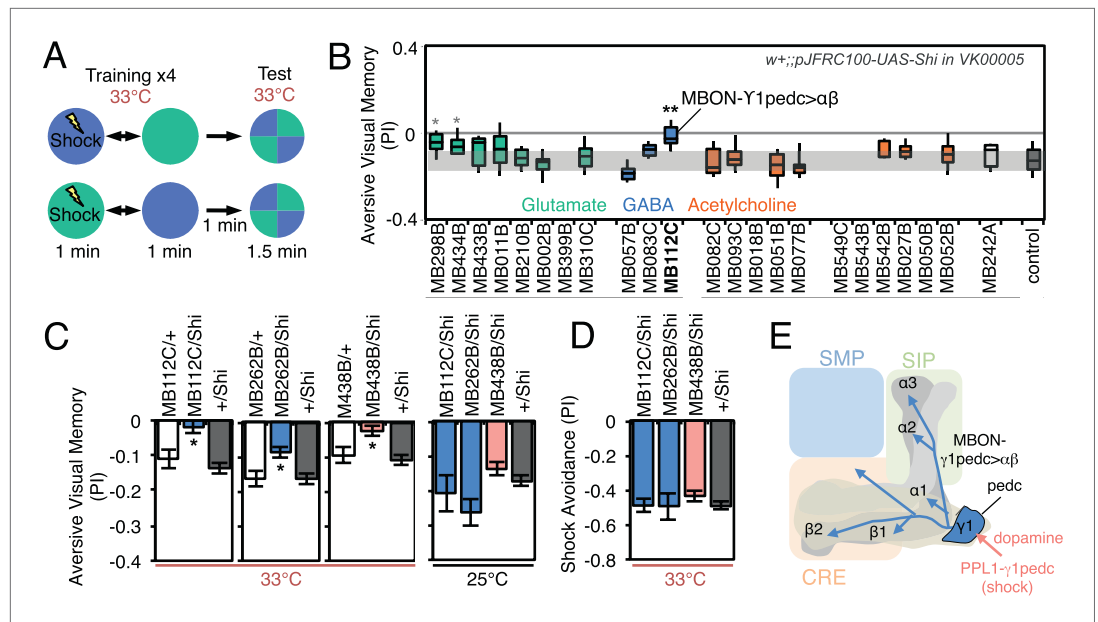


Figure 8. Requirement of MBONs for aversive visual memory. **(A)** Diagram of the training protocol used for aversive visual conditioning. Groups of 30–40 flies were trained in a circular arena with green or blue LED light and electric shock in a reciprocal manner, as in olfactory conditioning. Training was repeated four times and memory was tested immediately after the last training session. The PI corresponds to the mean of the [(number of flies in the blue quadrant minus number of flies in green quadrant)/total number of flies when blue was paired with electric shock] and [(number of flies in the green quadrant minus number of flies in the blue tube)/total number of flies when green was paired with electric shock]; See ‘Materials and methods’ for more detail. **(B)** Results for the requirement of MBONs in aversive visual conditioning. *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) was used to block synaptic transmission. Flies were trained and tested at the restrictive temperature. MBONs have been grouped by neurotransmitter and color-coded. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01. The two lines marked with gray asterisks failed one of the control assays: MB434B/Shi did not differ significantly from MB434B/+ and MB298B had altered color preference. One line, MB112C, with significantly impaired memory passed all control assays (see panel C). **(C)** Blocking MBON- γ 1pedc> α/β with either of two split-GAL4 lines (MB262B and MB112C) caused significant visual memory impairment compared to GAL4/+ and +/Shi controls. Blocking the output of PPL1- γ 1pedc dopaminergic neurons (MB438B) also resulted in a strong defect. Split-GAL4/Shi flies were not impaired at the permissive temperature compared to +/Shi. Bars and error bars show mean and standard error of the mean. **(D)** Electric shock avoidance in untrained flies was not impaired at restrictive temperature compared to +/Shi. Bars and error bars show mean and standard error of the mean. **(E)** Diagram of the MB circuit for aversive visual memory. The GABAergic MBON- γ 1pedc> α/β is required for conditioned color preference. The dopaminergic PPL1- γ 1pedc neurons terminate in the same compartments where the dendrites of MBON- γ 1pedc> α/β are found; they likely convey the electric shock punishment signal.

DOI: [10.7554/eLife.04580.022](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.022)

The following figure supplement is available for figure 8:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s that caused aversive visual memory phenotypes.

DOI: [10.7554/eLife.04580.023](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.023)

Donlea et al., 2011). Little is known about how the MB's sleep regulating functions are executed. As a first step in elucidating these mechanisms, we asked if activation of specific MBONs changed sleep pattern and amount.

Sleep was measured before, during, and after heat-gated activation of MBONs (**Figure 12A**) by expression of the temperature-gated dTrpA1 channel. We identified five MBON drivers that suppressed sleep and seven MBON drivers that increased sleep (**Figure 12B**). All five sleep-suppressing drivers express in glutamatergic MBONs (MBON- γ 5 β '2a, MBON- β '2mp, MBON- β '2a_bilateral and MBON- γ 4> γ 1 γ 2), while sleep-promoting drivers express either in GABAergic (MBON- γ 3 β '1 and

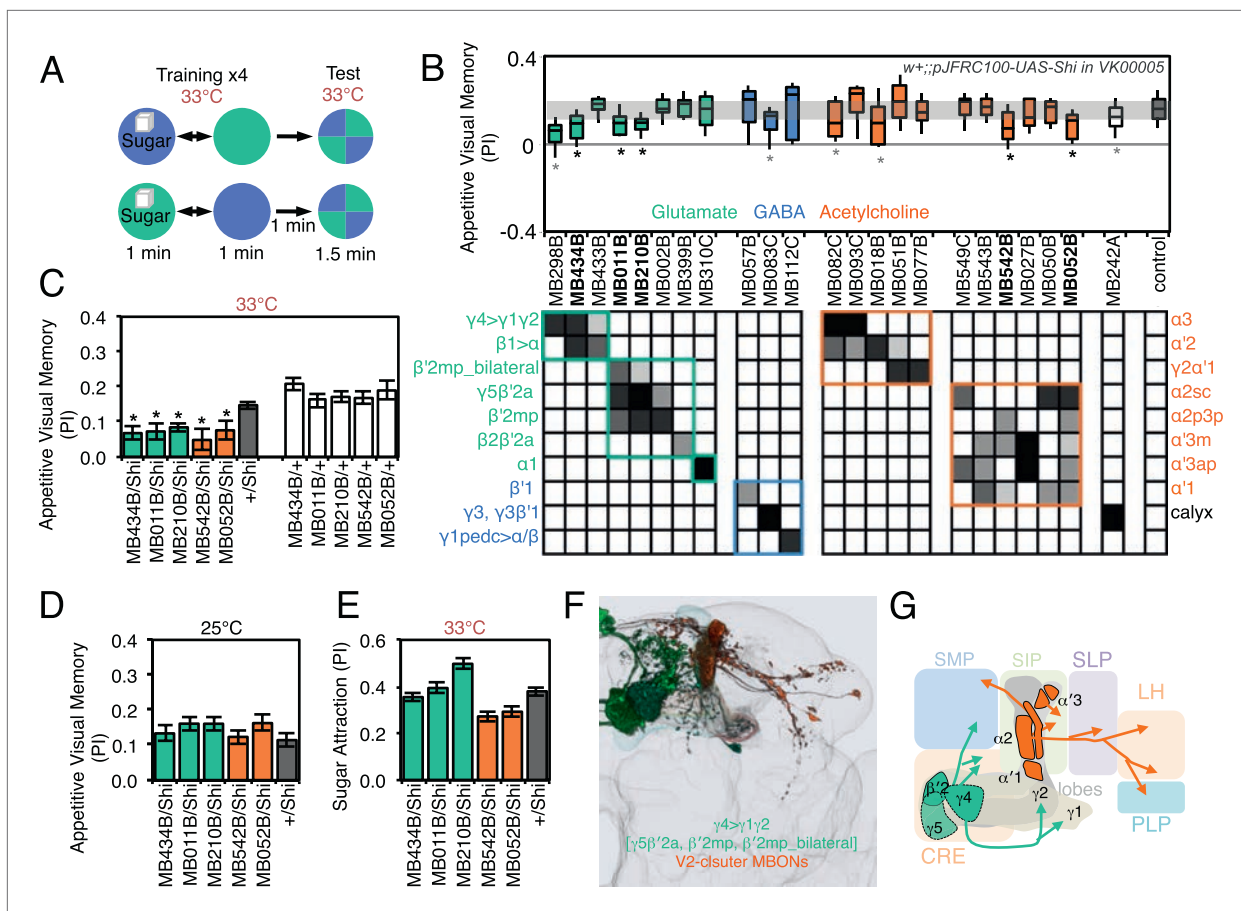


Figure 9. Requirement of MBONs for appetitive visual memory. **(A)** Diagram of the training protocol used for appetitive visual conditioning. Starved flies were trained with sugar and the PI calculated in the same manner as in aversive visual conditioning (see **Figure 8A**). Flies were trained and tested at the restrictive temperature. **(B)** Screening for MBONs required for aversive visual conditioning. *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) was used to block synaptic transmission. MBONs have been grouped by neurotransmitter and color-coded. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the line inside the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: *, *p* < 0.05. Gray asterisks indicate lines that were not significantly different from GAL4/+ controls (MB083C, MB082C, MB018B and MB242A) or had altered color preference (MB298B). The relative expression levels produced by the split-GAL4 driver lines in each cell type (indicated in a gray scale) are based on imaging with *pJFRC2-10XUAS-IVS-mCD8::GFP* (VK00005). Images of the expression patterns of selected drivers are shown in **Figure 9—figure supplement 1**. **(C)** Visual appetitive memory was impaired at restrictive temperature by blocking the subsets of glutamate or acetylcholine MBONs labeled by MB434B, MB011B, MB210B, MB542B and MB052B compared to +/Shi and GAL4/+ controls. **(D)** No appetitive visual memory impairment was found at the permissive temperature compared to +/Shi. **(E)** Sugar attraction in untrained flies was not impaired at the restrictive temperature compared to +/Shi. **(F)** Rendering of MBONs implicated in appetitive visual memory. MBONs grouped by square brackets represent cases where the available set of driver lines do not allow assigning an effect to a single cell type, but only to the bracketed set. **(G)** Circuit diagram for appetitive visual memory. Glutamatergic MBONs (MBON-β'2mp and MBON-γ5β'2a) mediate visual appetitive memory. PAM neurons innervating these compartments of the MB lobes (see **Figure 1A**) are thought to convey the sucrose reward signal (**Vogt et al., 2014**). MBON-γ4>γ1γ2 feeds forward onto the dendrites of MBON-γ1pedc>α/β, a neuron required for aversive odor and aversive visual memory. Cholinergic V2 cluster neurons also appear to play a role.

DOI: 10.7554/eLife.04580.024

The following figure supplement is available for figure 9:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s that caused appetitive visual memory phenotypes.

DOI: 10.7554/eLife.04580.025

MBON-γ3) or cholinergic MBONs (MBON-γ2α'1); the neurotransmitter for MBON-calyx has not been determined (**Figure 12B**). Despite the 48 hr period of dTrpA1 activation, the effects of activation were reversible and the temperature shift had only minor effects on sleep in genetic control groups (**Figure 12C**). We retested the split-GAL4 drivers that showed a significant effect in the primary screening using a different dTrpA1 effector inserted at another genomic location, allowing

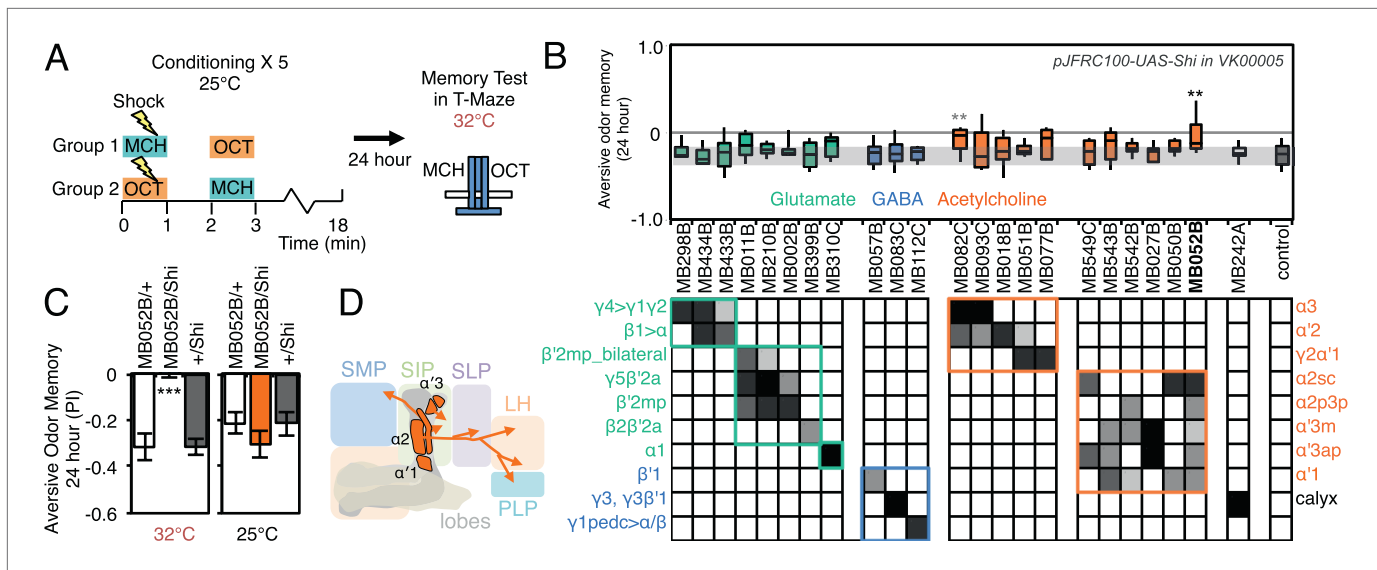


Figure 10. Requirement of long-term aversive odor memory. **(A)** Diagram of the conditioning protocol. Training sessions with electric shocks were repeated five times with 15 min intervals between training, all at the permissive temperature (25°C). Following training, flies were kept for 24 hr at 18°C, then shifted to the restrictive temperature (32°C) 30 min prior to test. The PI corresponds to the mean of the [(number of flies in the OCT tube minus number of flies in the MCH tube)/total number of flies when OCT was paired with electric shock] and [(number of flies in the MCH tube minus number of flies in the OCT tube)/total number of flies when MCH was paired with electric shock]. **(B)** Results of the primary screening for MBONs required for long-term aversive memory retrieval. *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10 (VK00005)* was used to block synaptic transmission. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the line inside the box is the median. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: **: *p* < 0.01. The relative expression levels produced by the split-GAL4 driver lines in each cell type (indicated by the gray scale) are based on imaging with *pJFRC100-10XUAS-IVS-mCD8::GFP (VK00005)*. Two lines, MB052B and MB082C showed significant memory impairment. MB082C drives expression in MBON- α 3 and to a lesser extent in MBON- α 2. In subsequent control experiments, MB082C/Shi^{ts} showed significant impairment compared to MB082C/+ and +/Shi^{ts} (data not shown). However, we were unable to attribute this aversive LTM phenotype to MBON- α 3, because blocking this cell type by other drivers did not result in a consistent phenotype (MB093C, **Figure 10B**; G0239, (Placais et al., 2013)). The requirement for MBON- α 3 for aversive odor LTM has been reported, but it is unclear whether these neurons are required for canonical LTM after spaced training (Pai et al., 2013) or instead for so-called ‘fasting LTM’, a memory that mildly fasted flies can form after a single cycle of conditioning (Hirano and Saitoe, 2013; Placais and Preat, 2013; Placais et al., 2013). We note that these same two split-GAL4 driver lines for MBON- α 3 (MB082C and MB093C) also showed discordant results in the ethanol memory assay (see below), suggesting some underlying difference between the two lines, perhaps in off-targeted expressions or genetic background. **(C)** MB052B/Shi showed memory impairment compared to MB052B/+ and +/Shi at the restrictive temperature but not at the permissive temperature. Statistical tests are described in methods: ***, *p* < 0.001. **(D)** Diagram of the output neurons that are required for long-term aversive odor memory. MB052B labels five cell types of cholinergic MBONs from the vertical lobes, four of them project to the lateral horn. Lines labeling only a subset of these MBONs gave only small effects when blocked.

DOI: 10.7554/eLife.04580.026

us to assess expression more accurately since we had access to a reporter construct inserted at that site (**Figure 12—figure supplement 1**); these assays confirmed the initial results for all but one of the split-GAL4 driver lines (**Figure 12D**). None of the lines showed significant effects on general locomotion as assessed by video tracking (see ‘Materials and methods’). We identified distinct MBONs that either decrease (**Figure 12E**) or increase sleep (**Figure 12F**). The subset of MBONs that promoted sleep was similar to the subset in which CsChrimson activation was attractive; conversely, the MBON subset that promoted wakefulness was similar to the subset in which CsChrimson activation was aversive.

The projection patterns of MBONs provide insight into how these bidirectional signals might be integrated in the fly brain (**Figure 12G**). For example, the axons of the sleep promoting cholinergic MBON- γ 2 α 1 and wake promoting glutamatergic MBON- β 2mp project their termini to the same location in the brain (**Video 6**). These circuit arrangements of sleep- and wake-promoting neurons may facilitate the transition between the sleep and wake behavioral states by providing opposing inputs to shared downstream targets.

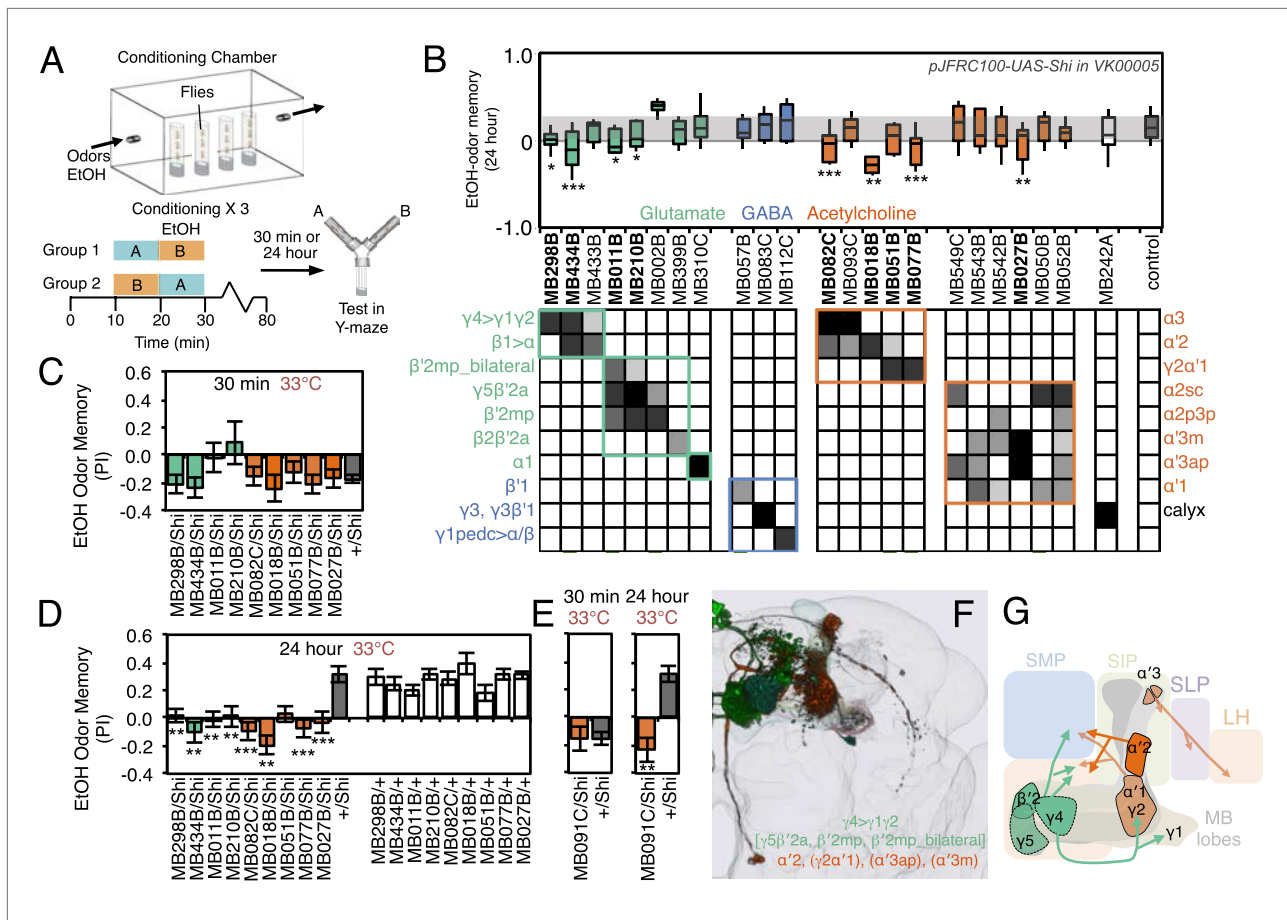


Figure 11. Requirement of MBONs for appetitive odor-ethanol intoxication memory. **(A)** Diagram of odor conditioning using ethanol vapor. Conditioned ethanol preference is measured by presenting two odors in sequence, one in the presence of an intoxicating dose of ethanol, three times for 10 min with 50-min breaks between exposures, followed by testing for preference between the two odors in a Y-maze in the absence of ethanol either 30 min or 24 hr after training. Wild-type flies find the ethanol-paired odor to be aversive when tested 30 min after training, but appetitive 24 hr after training. **(B)** Results of assays for the requirement of MBONs in ethanol-induced appetitive odor memory. *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) was used to block synaptic transmission during training and test; flies were kept at the permissive temperature for the 24 hr between training and test. MBONs have been grouped by neurotransmitter and color-coded. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001. The relative expression levels produced by the split-GAL4 driver lines in each cell type (indicated by the gray scale) are based on imaging with *pJFRC2-10XUAS-IVS-mCD8::GFP* (VK00005). Images of the expression patterns of selected drivers are shown in **Figure 11—figure supplement 1**. **(C)** 30-min ethanol-induced odor memory. **(D)** 24-hr ethanol-induced appetitive odor memory compared to +/Shi and GAL4/+ genetic controls. **(E)** Blocking transmission in MBON- α 2 with MB091C resulted in a failure to switch from aversive to appetitive memory for ethanol intoxication, confirming the result seen with MB018B. **(F)** Renderings of the MBONs implicated in 24 hr ethanol odor memory. MBONs grouped by square brackets represent cases where the available set of driver lines do not allow assigning an effect to a single cell type, but only to that set of MBONs. MBONs cell types in parentheses indicate cases where the data implicating them are only suggestive. **(G)** Schematic of potential circuits for appetitive ethanol memory. Cholinergic outputs from the MBON- α 2 and MBON- γ 2 α 1, and glutamatergic MBON- γ 4> γ 1 γ 2, MBON- γ 5 β '2 α and MBON- β '2mp are implicated in appetitive ethanol memory. MBONs for which the data shows inconsistency across driver lines (MBON- α 3 and MBON- γ 2 α '1) are shown in a lighter color; additional experiments will be required to resolve the role of these MBONs.

DOI: 10.7554/eLife.04580.027

The following figure supplement is available for figure 11:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s that caused odor-ethanol intoxication memory phenotypes.

DOI: 10.7554/eLife.04580.028

Discussion

In the insect brain, a sparse and non-stereotyped ensemble of Kenyon cells represents environmental cues such as odors. The behavioral response to these cues can be neutral, repulsive or attractive, influenced by the prior experiences of that individual and how dopaminergic and other modulatory inputs

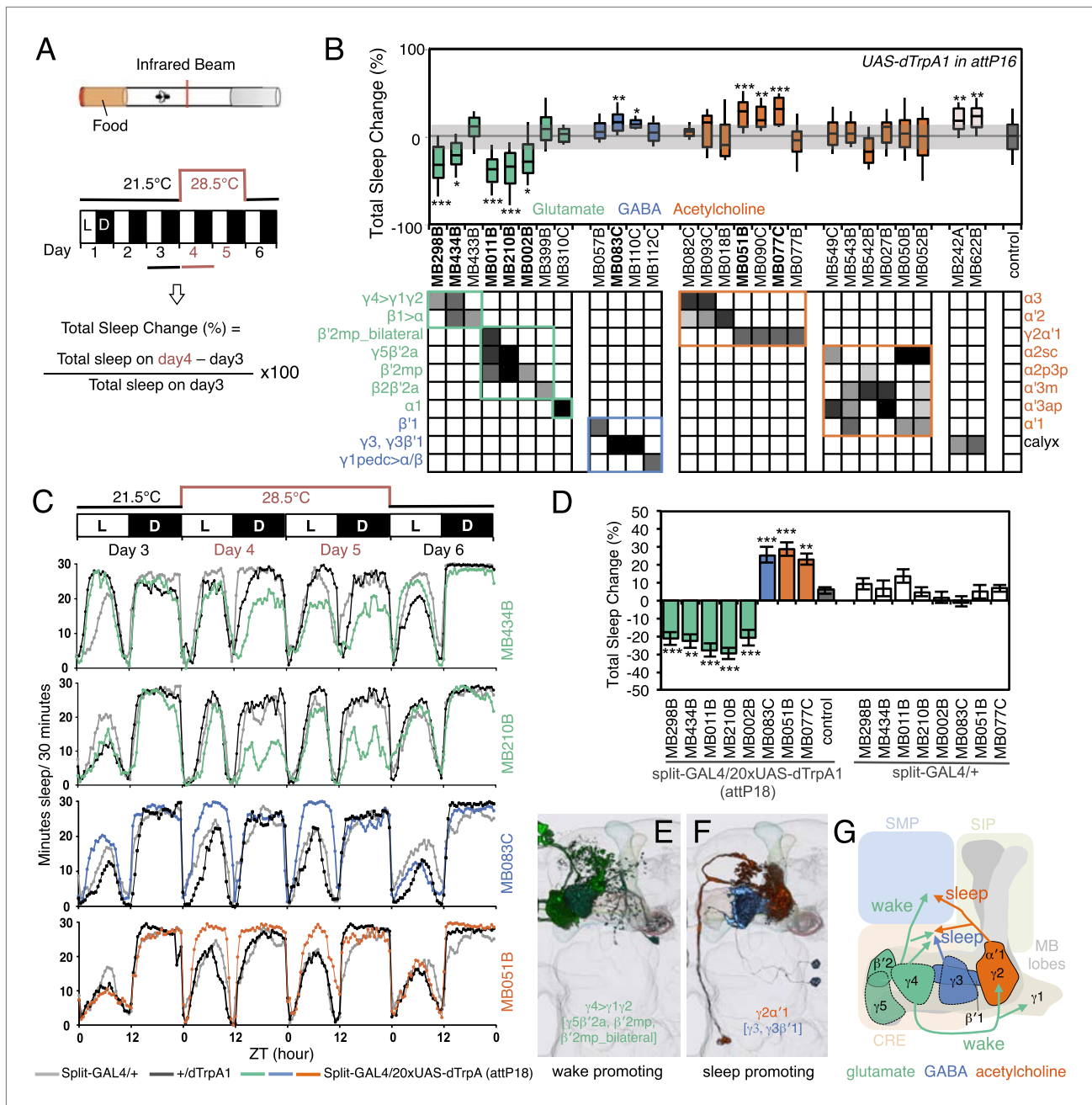


Figure 12. MBONs bi-directionally regulate sleep. **(A)** Top: Schematic of the experimental apparatus used for assaying sleep. Single flies are placed in a tube and activity is measured by counting the number of times the fly crosses an infrared beam. Bottom: Diagram of the experimental assay. Sleep was measured at 21.5°C for 3 days to establish the baseline sleep profile. Flies were then shifted to 28.5°C for 2 days to increase activity of the targeted cells by activating the dTrpA1 channel, and then returned to 21.5°C after activation to assay recovery. The effect of MBON activation on sleep amount is quantified as percentage change in sleep. Negative and positive values indicate decreased and increased sleep, respectively. **(B)** Box plots of change in sleep induced by dTrpA1 [*UAS-dTrpA1 (attP16)*; (*Hamada et al., 2008*)] mediated activation of the neurons targeted by each of the indicated split-GAL4 driver lines. MBONs are grouped by neurotransmitter and color-coded as indicated. The bottom and top of each box represents the first and third quartile, and the horizontal line dividing the box is the median. The whiskers represent the 10th and 90th percentiles. The gray rectangle spanning the horizontal axis indicates the interquartile range of the control. Statistical tests are described in methods: *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001. The matrix below the box plots shows the relative levels of expression (indicated by the gray scale) in the cell types observed with each driver line using *pJFRC200-10XUAS-IVS-myr::smGFP-HA (attP18)*. Images of the expression patterns of selected drivers are shown in **Figure 12—figure supplement 1**. **(C)** Sleep profiles of four split-GAL4 lines are shown. Each plot shows a 4-day period starting with subjective dawn. Sleep duration (min/30 min) on day 3 (21.5°C; permissive temperature), days 4, 5 (28.5°C; non-permissive temperature) and day 6 (21.5°C; permissive temperature) are plotted (colored line, *Figure 12*. Continued on next page

Figure 12. Continued

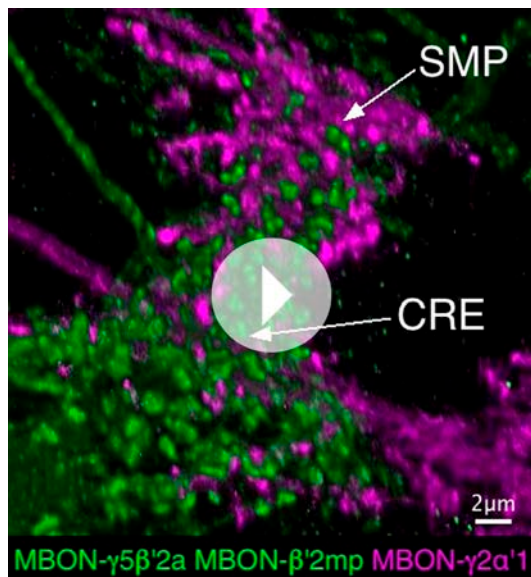
split-GAL4 line in combination with *pJFRC124-20XUAS-IVS-dTrpA1 (attP18)*; black line, represents +/dTrpA1; gray line, split-GAL4/+). (D) Sleep phenotypes were replicated with *pJFRC124-20XUAS-IVS-dTrpA1 (attP18)* for the eight drivers shown, but not for MB242A (not shown). Corresponding split-GAL4/+ flies showed normal sleep. (E, F) Renderings of MBONs responsible for the decreasing (E) or increasing (F) sleep. MBONs are color-coded based on their putative transmitter. (G) Diagram of MBONs responsible for the sleep regulation. MBONs are color-coded based on their putative transmitter as indicated. The wake promoting glutamatergic MBON- $\gamma 5\beta'2a$, MBON- $\beta'2mp$ and MBON- $\beta'2mp_{bilateral}$ converge with the sleep promoting cholinergic MBON- $\gamma 2\alpha'1$ and GABAergic MBON- $\gamma 3$ and MBON- $\gamma 3\beta'1$ in the SMP and CRE. The wake-promoting glutamatergic MBON- $\gamma 4 > \gamma 1\gamma 2$ terminates in the dendritic region of MBON- $\gamma 2\alpha'1$.

DOI: [10.7554/eLife.04580.029](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.029)

The following figure supplement is available for figure 12:

Figure supplement 1. Expression patterns of split-GAL4s that caused sleep phenotypes.

DOI: [10.7554/eLife.04580.030](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.030)



Video 6. Convergence of glutamatergic and cholinergic MBONs. Rendering of two-color labeling for the glutamatergic MBON- $\beta'2mp$ and weakly labeled MBON- $\gamma 5\beta'2a$ (MB074C; green) and cholinergic MBON- $\gamma 2\alpha'1$ (*R25D01-LexAp65* in *attP40*; magenta). A small area dorsal to the MB medial lobes (an area that includes part of the CRE and the SMP) is shown.

DOI: [10.7554/eLife.04580.031](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.031)

have changed the weight of its KC-MBON synapses. MBONs are thought to encode the predictive value associated with a stimulus. A fly would then use that information to bias its selection of behavioral responses in an ever-changing environment. In the accompanying paper (Aso et al., 2014), we describe in detail the projection patterns of the MBON and DAN cell types that comprise the MB lobes in *Drosophila*. In this report, we begin the process of determining the nature of the information conveyed by MBONs. We also correlate specific MBON cell types with roles in associative memory and sleep regulation (Figure 13). Our anatomical and behavioral results lay the groundwork for understanding the circuit principles for a system of memory-based valuation and action selection.

The ensemble of MBONs represents valence and biases choice

We demonstrated that optogenetic activation of MBONs in untrained flies can induce approach or avoidance. The ability of the MBONs to induce changes in behavior in the absence of odors suggests that MBONs can bias behavior directly. This observation is consistent with a recent study showing that flies are able to associate artificial

activation of a random set of KCs—instead of an odor stimulus—with electric shock, and avoid reactivation of the same set of KCs in the absence of odors (Vasmer et al., 2014), a result that recapitulates a finding in the potentially analogous piriform cortex of rodents (Choi et al., 2011). We found that the sign of the response to MBON activation was highly correlated with neurotransmitter type; all the MBONs whose activation resulted in avoidance were glutamatergic, whereas all the attractive MBONs were cholinergic or GABAergic.

By tracking flies as they encounter a border between darkness and CsChrimson-activating light, we showed that activation of an MBON can bias walking direction. Although activation of glutamatergic MBONs repelled flies, the avoidance behaviors were not stereotyped; flies showed a variety of motor patterns when avoiding the red light. This observation implies that MBONs are unlikely to function as command neurons to drive a specific motor pattern, as has been observed, for example, in recently identified descending neurons that induce only stereotyped backward walking (Bath et al., 2014; Bidaye et al., 2014).

Rather, we view fly locomotion as a goal-directed system that uses changes in MBON activity as an internal guide for taxis. For example, walking in a direction that increases the relative activity of

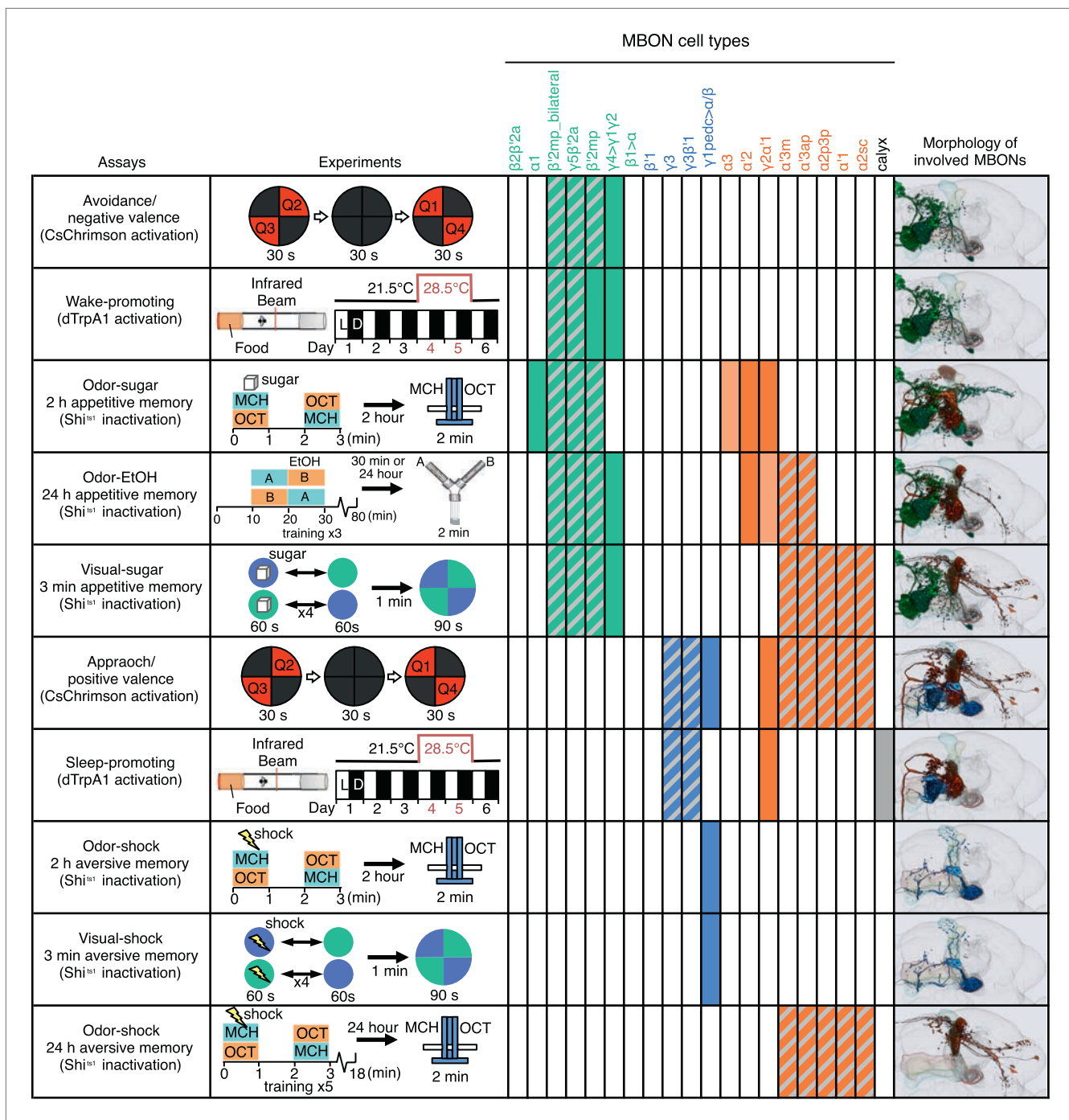


Figure 13. A map of MBON functions. A matrix summarizing the MBON cell types identified in each of the behavior assays is shown. In the cells of the matrix representing MBON cell types, solid colors were assigned when manipulation of that cell type alone caused a significant behavioral phenotype. Hatched cells indicate cases where we observed a significant behavioral phenotype, but the driver line used labeled a combination of cell types. In these cases, our data only allow us to assign the phenotypic effect to that group of MBONs. The light colored cells indicate two cases where our data suggested the involvement of a cell type, but was not conclusive. See Results for details. Avoidance, attraction, wake-promoting and sleep-promoting phenotypes reflect the results of activating MBONs; the other assays measured the effects of blocking synaptic transmission. Activation of glutamatergic MBONs repelled flies and promoted wakefulness, whereas activation of GABAergic or cholinergic MBONs attracted flies and promoted sleep. In general, more cell types were involved in appetitive memory than in aversive memory. Partially overlapping set of cholinergic and glutamatergic MBONs were required for all three appetitive memory assays. The same GABAergic MBON- $\gamma 1pedc>\alpha/\beta$ was required for short-term olfactory and visual memory in an assay protocol that did not distinguish between formation or retrieval, whereas long-term aversive odor memory retrieval required the V2 cluster MBONs.

DOI: [10.7554/eLife.04580.032](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.032)

aversive-encoding MBONs, which would occur as a fly approaches an odorant it had previously learned to associate with punishment (or when a fly expressing C_sChrimson in an avoidance-inducing MBON approaches the C_sChrimson activating light as in **Figure 5E**), signals the locomotive system to turn around and walk the other direction. Detailed studies of locomotor circuitry will be required to determine the mechanisms of executing such taxic behaviors and should help elucidate how MBON inputs guide this system.

In this view, the MBON population functions as neither a purely motor nor a purely sensory signal. From the motor perspective, as described above, MBONs bias locomotive outcomes rather than dictate a stereotyped low-level motor program. From the sensory perspective, we have shown that the same MBONs can be required for experience-dependent behavioral plasticity irrespective of whether a conditioned stimulus is a color or an odor, and irrespective of the specific identity of the odor. Taken together with the fact that MBONs lie immediately downstream of the sites of memory formation, these observations support our proposal that MBONs convey that a stimulus has a particular value—but not the identity of the stimulus itself. This contrasts with sensory neurons whose activity can also induce approach or avoidance, but which do convey the stimulus per se. In mammals, neural representations of abstract variables such as ‘value’, ‘risk’ and ‘confidence’ are thought to participate in cognition leading to action selection (for example, see *Kepecs et al., 2008; Kiani and Shadlen, 2009; Levy et al., 2010; Yanike and Ferrera, 2014*). From the point of view of this framework, the MBON population representing the value of a learned stimulus and informing locomotion might be operationally viewed as a cognitive primitive.

Co-activating multiple MBON cell types revealed that the effects of activating different MBONs appear to be additive; that is, activating MBONs with the same sign of action increases the strength of the behavioral response, whereas activating MBONs of opposite sign reduces the behavioral response. Thus, groups of MBONs, rather than individual MBONs, likely act collectively to bias behavioral responses. Consistent with the idea of a distributed MBON population code, all 19 MBON cell types imaged so far show a calcium response to any given odor (Hige et al., unpublished, *Sejourne et al., 2011; Pai et al., 2013; Placais et al., 2013*).

If it is the ensemble activity of a large number of MBONs that determines memory-guided behavior, how can local modulation of only one or a few MB compartments by dopamine lead to a strong behavioral response? Activation of a single DAN such as PPL1- γ 1pedc that innervates a highly localized region of the MB can induce robust aversive memory, yet the odor associated with the punishment will activate MBONs from all compartments, including MBONs that can drive approach as well as those that drive avoidance. We propose that, in response to a novel odor stimulus, the activities of MBONs representing opposing valences may initially be ‘balanced’, so that they do not impose a significant bias. Behavior would then be governed simply by any innate preference a fly might have to that odor, using neuronal circuits not involving the MB. Now suppose an outcome associated with that stimulus is learned. Such learning involves compartment-specific, dopamine-dependent plasticity of the KC-MBON synapses activated by that stimulus. If that occurs, the subsequent ensemble response of the MBONs to that stimulus would no longer be in balance and an attraction to, or avoidance of, that stimulus would result. Consistent with this idea, eliminating MB function by disrupting KCs, which are nearly 10% of neurons in the central brain, had surprisingly minor effects on odor preference (*de Belle and Heisenberg, 1994; Heisenberg et al., 1985; McGuire et al., 2001*). **Figure 14** shows a conceptual model of how this could be implemented at the level of neuronal circuits.

Synaptic plasticity underlying associative memory

Recent studies of dopamine signaling have implicated distinct sites of memory formation within the MB lobes (summarized in **Figure 1A**) (*Schroll et al., 2006; Claridge-Chang et al., 2009; Aso et al., 2010, 2012; Burke et al., 2012; Liu et al., 2012; Perisse et al., 2013*). Consistent with this large body of work, we found that one type of PPL1 cluster DAN, PPL1- γ 1pedc, played a central role in formation of aversive memory in both olfactory (**Figure 6**; see also *Aso et al., 2012; Aso et al., 2010*) and visual learning (**Figure 8**) paradigms. This DAN also mediates aversive reinforcement of bitter taste (*Das et al., 2014*). For appetitive memory, PAM cluster DANs that innervate other regions of the MB lobes, in particular the compartments of glutamatergic MBONs, are sufficient to induce appetitive memory (*Yamagata et al., in press*) (*Burke et al., 2012; Liu et al., 2012*) (*Perisse et al., 2013*). These results strongly suggest that the synaptic plasticity underlying appetitive and aversive memory generally occurs in different compartments of the MB lobes.

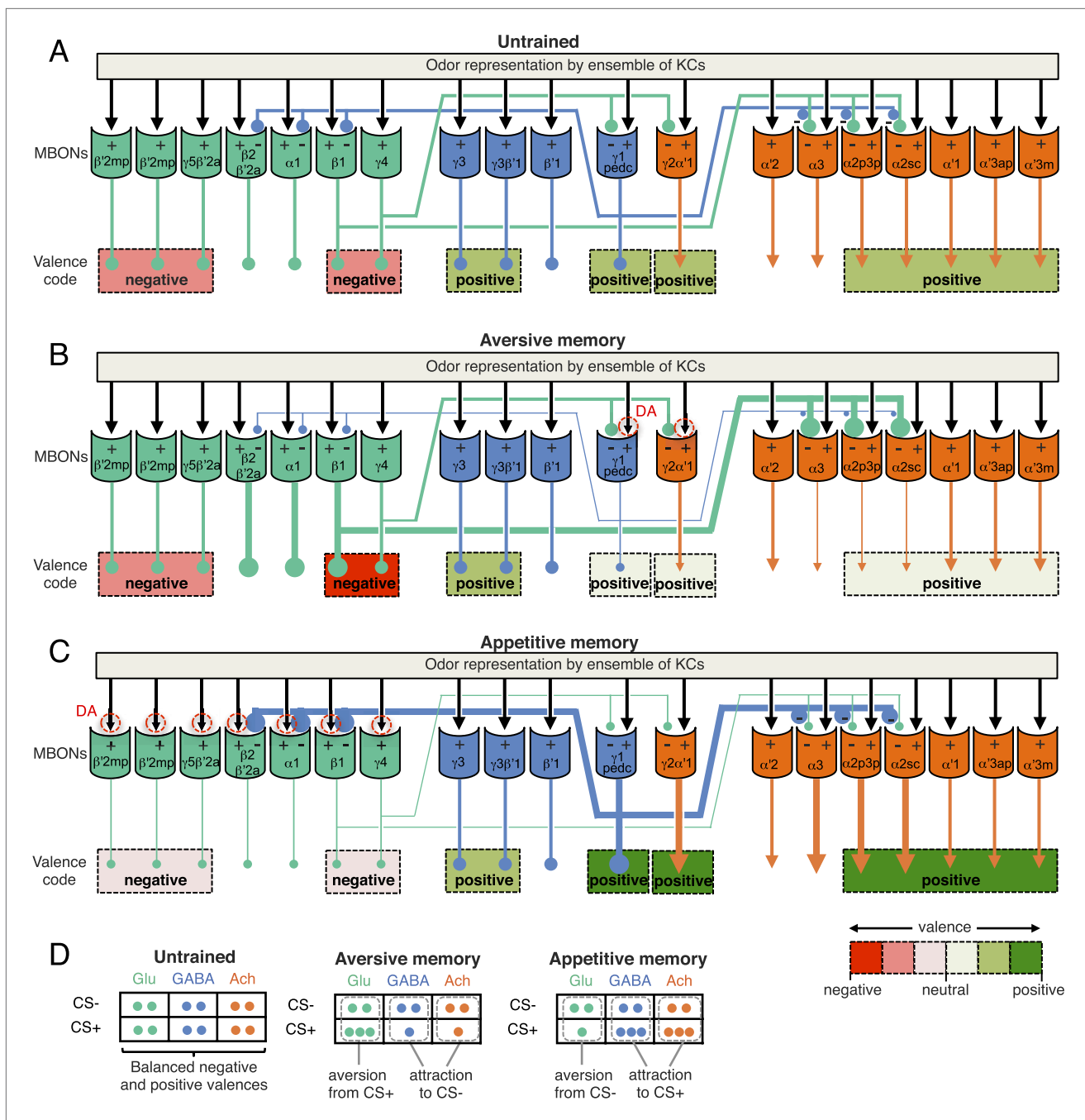


Figure 14. A simplified circuit model for the encoding of learned valence by MBONs ensemble and feedforward network. **(A)** In response to an odor, a sparse ensemble of Kenyon cells provides excitatory synaptic input to MBONs (black arrows; Hige et al., unpublished) (Cassenaer and Laurent, 2007). Glutamatergic (Glu; green), GABAergic (GABA; blue) and cholinergic (Ach; orange) MBONs all receive KC input; the names of MBONs are based on the lobe compartment where their dendrites arborize. CsChrimson activation of some glutamatergic MBONs can be repulsive, whereas activation of GABA or cholinergic MBONs can be attractive (color coded as indicated by the scale at bottom right) (Figure 2C). We often only observed significant behavioral effect with combinations of cell types (indicated by dashed lines grouping multiple cell types). MBON- $\gamma'1pedc > \alpha/\beta$, and glutamatergic MBONs, MBON- $\beta'1 > \alpha$ and MBON- $\gamma'4 > \gamma'1\gamma'2$, have synaptic terminals inside the compartments of MB lobes (Aso et al., 2014). While the microcircuits within each MB compartment remain to be elucidated, our light level anatomical studies have enumerated the cell types present in each compartment. The $\alpha'2$ and $\alpha'3$ compartments contain the dendrites of cholinergic MBONs and are targeted by both the GABAergic MBON- $\gamma'1pedc > \alpha/\beta$ and the glutamatergic MBON- $\beta'1 > \alpha$. These MBONs cover only a small fraction of volume in their target compartments (see Figure 6—figure supplement 1); since they could contact only a fraction of Kenyon cells, we propose that they target MBONs directly. Here we hypothesize that glutamate is inhibitory to cholinergic and GABAergic MBONs, and GABA is inhibitory to glutamatergic MBONs (inhibitory connections are indicated by circles). The thickness of lines and size of their endings Figure 14. Continued on next page

Figure 14. Continued

are meant to indicate activity levels. (B) PPL1- γ 1pedc DANs play a major role to mediate punishment signals to the MB for formation of aversive memory together with minor contribution from other DANs including PPL1- γ 2 α '1 (Aso et al., 2012). If an aversive memory is formed by the simultaneous presentation of an odor and punishment and results in a synaptic depression of KC terminals by dopamine (represented by red dashed circles), the response of the GABAergic MBONs to the CS+ would be depressed (see text). Reduced GABAergic inhibitory input would then increase the CS+ response of glutamatergic MBONs, whereas the CS+ response of cholinergic MBONs would be reduced because of dis-inhibition of the inhibitory glutamatergic MBONs. The end result is enhanced activity of aversion-mediating glutamatergic MBONs together with the reduced activity of attraction-mediating GABAergic and cholinergic MBONs in response to CS+. The CS- is represented by a different set of KCs whose synaptic connections to the MBONs would not be expected to be modified by training and so the responses of the ensemble of MBONs to the CS- would remain balanced. The change in response of the MBONs to the CS+, relative to their unchanged response to the CS-, biases choice toward the CS+ (see diagram in panel D). This model is consistent with the essential role of MBON- γ 1pedc> α / β in aversive memory. Also, cholinergic MBONs in V2 cluster have been shown to reduce their response to an odor after olfactory conditioning with electric shock (Séjourné et al., Nat. Neurosci., 2011), although we detected their requirement only for long-term memory, but not for 2 hr memory. This model predicts a role for glutamatergic MBONs, but we did not observe significant effect by blocking subsets of glutamatergic MBONs (Figures 6 and 8). Thus, to test this model, it will be necessary to block broader sets of glutamatergic MBON cell types by using combinations of split-GAL4 drivers. (C) In contrast to aversive memory in which one type of DAN (PPL1- γ 1pedc) plays a major role in memory formation, reward signals are mediated by a distributed set of PAM cluster DANs that innervate the compartments of glutamatergic MBONs (Yamagata et al., in press) (Burke et al., 2012; Liu et al., 2012; Perisse et al., 2013). If an appetitive memory is formed by synaptic depression of KC terminals in response to dopamine release, the response of the glutamatergic MBONs to the CS+ would be depressed. The resultant reduced glutamatergic inhibitory input to the GABAergic and cholinergic MBONs would increase their response to the CS+. In turn, increased GABAergic input to glutamatergic MBONs may further amplify and stabilize the initial effects of plasticity. The end result would be reduced activity of aversion-mediating glutamatergic MBONs together with the increased activity of attraction-mediating GABAergic and cholinergic MBONs in response to CS+. This model is consistent with requirement of glutamatergic MBONs: blocking the M4/M6 cluster MBONs (MBON- γ 5 β '2a, MBON- β '2mp and MBON- β '2mp_bilateral; Table 1) by MB011B resulted in memory impairment for all three appetitive memory assays (Figures 7, 9 and 11). Blocking the MBON- γ 4> γ 1 γ 2 and MBON- β 1> α by MB434B resulted in memory impairment in two of three assays (Figures 9 and 11). While we did not detect a requirement for the GABAergic MBON- γ 1pedc> α / β in appetitive memory, previous study have shown that dopamine input to the γ 1 and pedc suppresses expression of appetitive memory in fed flies (Krashes et al., 2009), indicating some role of MBON- γ 1pedc> α / β in appetitive memory. Blocking cholinergic MBONs in the V3/V4 cluster (MBON- γ 2 α '1, MBON- α '2 and MBON- α '3) resulted in memory impairment in appetitive odor memories (Figures 7 and 11) (Placais et al., 2013) but not in appetitive visual memory (Figure 9). Some of driver lines for the cholinergic MBONs in the V2 cluster showed impairment of appetitive memory in all three assays (Figures 7, 9 and 11), although our data did not allow mapping to the resolution of specific cell types due to inconsistent results obtained using other lines. (D) In the matrix shown, the number of circles represents the activity levels of MBONs in response to the CS+ odor (the odor that is paired with the unconditioned stimulus during conditioning) and the CS- odor (a control odor). In untrained flies, the activities of MBONs for opposing effects are balanced. Dopamine modulation breaks this balance to bias the choice between CS+ and CS-.

DOI: 10.7554/eLife.04580.033

The sign of preference we observed in response to CsChrimson activation of particular MBONs was, in general, opposite to that of the memory induced by dopaminergic input to the corresponding MB compartments. For example, activation of MBON- γ 1pedc> α / β and MBON- γ 2 α '1 attracted flies (Figure 2), whereas DAN input to these regions induced aversive memory (Figure 6G) (Aso et al., 2010, 2012). Conversely, activation of glutamatergic MBONs repelled flies (Figure 2), while DAN input to the corresponding regions is known to induce appetitive memory (Yamagata et al., in press) (Burke et al., 2012; Liu et al., 2012) (Perisse et al., 2013). These results are most easily explained if dopamine modulation led to synaptic depression of the outputs of the KCs representing the CS+ stimulus. Consistent with this mechanism, the PE1 MBONs in honeybees (Okada et al., 2007) as well as the V2 cluster MBONs in *Drosophila* (Sejourné et al., 2011) reduce their response to a learned odor and depression of KC-MBON synapses has been shown for octopamine modulation in the locust MB (Cassenaer and Laurent, 2012). Moreover, long-term synaptic depression is known to occur in the granular cell synapses to Purkinje cells in the vertebrate cerebellum (Ito et al., 1982), a local neuronal circuit with many analogies to the MB (Schurmann, 1974; Laurent, 2002; Farris, 2011). Other mechanisms are also possible and multiple mechanisms are likely to be used. For example, dopamine may modulate terminals of KCs to potentiate release of an inhibitory cotransmitter such as short neuropeptide F, which has been demonstrated to be functional in KCs (Knapek et al., 2013) and hyperpolarizes cells expressing the sNPF receptor (Shang et al., 2013). RNA profiling of MBONs should provide insights into the molecular composition of synapses between KCs and MBONs. It is also noteworthy that the effect of dopamine can be dependent on the activity status of Kenyon cells; activation of PPL1- γ 1pedc together with odor presentation induces memory, while its activation without an odor has been reported to erase memory (Berry et al., 2012; Placais et al., 2012). In the vertebrate basal ganglia, dopamine dependent synaptic plasticity important for aversive and appetitive learning is known to result in both synaptic potentiation and synaptic depression (Shen et al., 2008).

Requirements for MBONs differ between behaviors

In this study, we looked at the effects of selectively and specifically manipulating the activities of a comprehensive set of MBONs on several behaviors. As a consequence, we gained some insights into the extent to which the relative importance of particular MBONs differed between behaviors (**Figure 13**). Most obvious was the segregation between appetitive and aversive behaviors. For example, we found that blocking MBON- $\gamma 1pedc>\alpha/\beta$ impaired both short-term aversive odor and visual memory, suggesting a general role in aversive memory independent of modality. Conversely, a subset of glutamatergic MBONs was required in all three appetitive memory assays. It still remains to be demonstrated that the outputs of these MBONs are required transiently during memory retrieval. Nevertheless, CsChrimson activation experiments demonstrate that activation of these MBONs can directly and transiently induce attraction and avoidance behaviors.

In the cases described above, the DANs and MBONs mediating a particular behavior innervate the same regions of MB lobes. We also found cases where the DANs and MBONs required for a behavior do not innervate the same compartments of the MB lobes. For example, even though several cholinergic MBONs are required for appetitive memory (**Placais et al., 2013**), the compartments with cholinergic MBONs do not receive inputs from reward-mediating PAM cluster DANs, but instead from PPL1 cluster DANs that have been shown to be dispensable for odor-sugar memory (**Schwaerzel et al., 2003**) (**Figure 1A**). What accounts for this mismatch? Perhaps these cholinergic MBONs' primary function is in memory consolidation rather than retrieval. But the fact that CsChrimson activation of the cholinergic MBON- $\gamma 2\alpha'1$ and V2 cluster MBONs resulted in attraction, strongly suggests that at least some of the cholinergic MBONs have a role in directly mediating the conditioned response. Indeed, previous studies found a requirement for cholinergic MBONs (the V2 cluster and MBON- $\alpha 3$) during memory retrieval (**Sejourne et al., 2011; Pai et al., 2013; Placais et al., 2013**). One attractive model is that requirement of cholinergic MBONs originates from the transfer of information between disparate regions of the MB lobes through the inter-compartmental MBONs connections within the lobes or by way of connections outside the MB, like those described in the next two sections.

Roles for the multilayered network of MBONs

The multilayered arrangement of MBONs (see Figure 17 of the accompanying manuscript) (**Aso et al., 2014**) provides a circuit mechanism that enables local modulation in one compartment to affect the response of MBONs in other compartments. Once local modulation breaks the balance between MBONs, these inter-compartmental connections could amplify the differential level of activity of MBONs for opposing effects (**Figure 14**). For example, the avoidance-mediating MBON- $\gamma 4>\gamma 1\gamma 2$ targets the compartments of attraction-mediating MBON- $\gamma 2\alpha'1$ and MBON- $\gamma 1pedc>\alpha/\beta$ (**Figure 14**).

This network topology might also provide a fly with the ability to modify its sensory associations in response to a changing environment (see Discussion in the accompanying manuscript) (**Aso et al., 2014**). Consider the α lobe. Previous studies and our results indicate that circuits in the α lobe play key roles in long-term aversive and appetitive memory (**Figure 10**) (**Pascual and Preat, 2001; Isabel et al., 2004; Yu et al., 2006; Blum et al., 2009; Sejourne et al., 2011; Cervantes-Sandoval et al., 2013; Pai et al., 2013; Placais et al., 2013**). The α lobe is targeted by MBONs from other compartments and comprises the last layer in the layered output model of the MB (**Figure 1B**; see also Figure 17 of the accompanying manuscript) (**Aso et al., 2014**). The GABAergic MBON- $\gamma 1pedc>\alpha/\beta$ and the glutamatergic MBON- $\beta 1>\alpha$ both project to $\alpha 2$ and $\alpha 3$, where their axonal termini lie in close apposition (see Figure 17 of the accompanying manuscript) (**Aso et al., 2014**). DAN input to the compartments housing the dendrites of these feedforward MBONs induces aversive and appetitive memory, respectively (this work) (**Perisse et al., 2013; Yamagata et al., in press**). As pointed out in (**Aso et al., 2014**), this circuit structure is well-suited to deal with conflicts between long-lasting memory traces and the need to adapt to survive in a dynamic environment where the meaning of a given sensory input may change. To test the proposed role of the layered arrangement of MBONs in resolving conflicts between old memories and new sensory inputs, we will also need behavioral paradigms that, unlike the simple associative learning tasks used in our current study, assess the neuronal requirements for memory extinction and reversal learning.

Network nodes for integrating innate and learned valences

The neuronal circuits that are downstream of the MBONs and that might read the ensemble of MBON activity remain to be discovered. However, the anatomy of the MBONs suggests that, at least in some

cases, summation and canceling effects may result from convergence of MBON terminals on common targets (Aso *et al.*, 2014). For example, the terminals of the sleep-promoting cholinergic MBON- $\gamma 2\alpha 1$ overlap with terminals of wake-promoting glutamatergic MBONs ($\gamma 5\beta 2a$, $\beta 2mp$ and $\beta 2mp$ bilateral) in a confined area in CRE and SMP. In addition, some MBONs appear to terminate on the dendrites of DANs innervating other compartments, forming feedback loops. Using these mechanisms, local modulation in a specific compartment could broadly impact the ensemble of MBON activity and how it is interpreted.

Testing these and other models for the roles of the MBON network, both within the MB lobes and in the surrounding neuropils, will be facilitated by an EM-level connectome to confirm the synaptic connections we have inferred based on light microscopy. We will also need physiological assays to confirm the sign of synaptic connections and to measure plasticity. For example, we do not know the sign of action of glutamate in the targets of glutamatergic MBONs, as this depends on the receptor expressed by the target cells (Xia *et al.*, 2005; Jan and Jan, 1976; Liu and Wilson, 2013). In this regard, we note that previous studies demonstrated a role for NMDA receptors in olfactory memory (Wu *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2012).

Neurons that are thought to mediate innate response to odors—a subset of projection neurons from the antennal lobes and output neurons from the lateral horn—also project to these same convergence zones (Figure 15; Figure 15—figure supplement 1). We propose that these convergence zones serve as network nodes where behavioral output is selected in the light of both the innate and learned valences of stimuli. What are the neurons downstream to these convergence zones? One obvious possibility is neurons that project to the fan-shaped body of the central complex whose dendrites are known to widely arborize in these same areas (Hanesch *et al.*, 1989; Young and Armstrong, 2010a; Ito *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). It would make sense for the MB to provide input to the central complex, a brain region involved in coordinating motor patterns (Strauss, 2002). Figure 15 provides a diagrammatic summary of these proposed circuits.

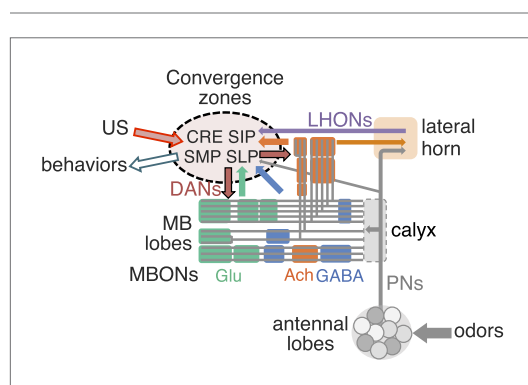


Figure 15. Convergence zone of MBON terminals as network nodes to integrate innate and learned valences. MB lobes are consisted of three groups of compartments based on the putative transmitter of MBONs (glutamate, GABA and acetylcholine; color-coded as indicated), which are interconnected inside the lobes and send converging outputs to the lateral horn, CRE, SMP, SIP and SLP. These regions also receive input from the antennal lobes and the lateral horn, some of which appear to be in close apposition to the terminals of MBONs and likely target common downstream neurons (see Figure 15—figure supplement 1). Therefore, these convergence zones are well positioned to function as integration sites for selecting adaptive behaviors based on both innate and learned valences.

DOI: [10.7554/eLife.04580.034](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.034)

The following figure supplement is available for figure 15:

Figure supplement 1. Convergence of olfactory pathways.

DOI: [10.7554/eLife.04580.035](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.035)

Dealing with redundancy and resiliency of networks

Using inactivation to uncover the roles of specific cell types is inherently limited by redundancy and resiliency within the underlying neural circuits. For example, consider the MBONs from the α/β lobes. The output of the α/β Kenyon cells is known to be required for retrieval of aversive memory (Isabel *et al.*, 2004; Krashes *et al.*, 2007; McGuire *et al.*, 2001; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2013). Our anatomical and behavioral results show that MBON- $\gamma 1pedc > \alpha/\beta$, a cell type we found to be critical for aversive memory, has terminals largely confined inside the α/β lobes, well-positioned to regulate a total 6 types of MBONs from the α/β lobes (Figure 1B). Yet we did not detect a requirement for any of these MBONs in short term aversive memory when tested individually. The ability to detect phenotypes also depends on the strength of the effector; for example, four glutamatergic MBON drivers showed aversive memory impairment in initial screening assays with a strong inhibitor of synaptic function, but we were not able to confirm these effects using a weaker effector (Figure 6B).

The failure to see effects when inactivating individual cell types is most easily explained by combinatorial roles and redundancy between MBONs. We note that this high level of resiliency is very reminiscent of observations made with

genetic networks, where less than half of gene knockouts of evolutionarily conserved *Drosophila* genes result in a detectable phenotype (Ashburner et al., 1999). Whether or not we detect a requirement for a particular MBON in a particular learning paradigm is likely to depend on which DANs are recruited by the US used in that paradigm as well as the degree of redundancy in the MBON representation of valence. It will be informative to test systematically whether blocking combinations of MBONs, which did not show significant behavioral effect when blocked separately, results in significant memory impairment. It will also be important in future experiments to employ imaging and electrophysiological methods, in which the activities of individual neurons, and the consequences of plasticity, can be observed without being obscured by redundancy.

Origin of diverse functions of MBONs

The MBs are implicated in functions beyond processing of associative memory (Martin et al., 1998; Liu et al., 1999; Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006; Zhang et al., 2007; Hong et al., 2008). MBONs that influence approach to, or avoidance of, a learned stimulus may also have roles in innate preference behaviors for temperature and hunger-dependent CO₂ avoidance (Hong et al., 2008; Bang et al., 2011; Bracker et al., 2013). Moreover, we expect the behavioral repertoire that MBONs govern to go beyond simple approach and avoidance; the MB is known to play a role in experience-dependent regulation of proboscis extension (Masek and Scott, 2010) and courtship (McBride et al., 1999) as well as regulation of sleep (Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006) and post-mating behaviors such as oviposition (Fleischmann et al., 2001; Azanchi et al., 2013). Intriguingly, we found that MBONs whose activation was repulsive promoted wakefulness, whereas MBONs whose activation was attractive promoted sleep; it would make sense for flies to be awake and attentive in an adverse environment. Other internal states, in addition to sleep, are likely to affect the decision to carry out a particular memory-guided behavior; for example, the state of satiety has been shown to regulate memory expression (Krashes et al., 2009). The diverse influences of MBONs on behavior can be most easily explained if we assume that the activity of the ensemble of MBON conveys an abstract representation of both valence and internal state. In this view, the ensemble of MBONs may represent internal states along axes such as pleasant-unpleasant or aroused-not aroused. It is upon these axes that primitive forms of emotion are thought to have evolved (Anderson and Adolphs, 2014).

Materials and methods

Genetic and anatomical methods

The construction and characterization of the split-GAL4 lines are described in detail in (Aso et al., 2014). The MBON cell types are listed in Table 1 and diagrammed in Figure 1B. The split-GAL4 lines used in this study are described in Table 2; expression patterns, using the most relevant UAS-reporter, are shown in the Figures. *pBDPGAL4U (attP2)*, an enhancerless GAL4 construct (Pfeiffer et al., 2010), was used as a control driver line in behavioral assays.

To combine the expression patterns observed in two split-GAL4 lines, flies were generated by standard genetic crosses that contained the two DNA-binding (DBD) halves and the two activation-domain (AD) halves found in the parent split-GAL4 lines; the AD and DBD components of all split-GAL4 lines are given in Table 1 of the accompanying manuscript (Aso et al., 2014). In general, these lines contained more off-target cells than the parent split-GAL4 lines, due to the interactions of the AD and DBD combinations not present in the parent lines. To identify lines for behavioral experiments, we directly assessed the expression patterns; the majority of combinations produced useful reagents (Figure 4—figure supplement 1 shows the expression patterns of those combinations used in this work).

The following constructs were used for activating or silencing neuronal function: *5XUAS-CsChrimson-mVenus (attP18)*, *10XUAS-CsChrimson-mVenus (attP18)*, *20XUAS-CsChrimson-mVenus (attP18)* (Klapoetke et al., 2014); *pJFRC124-20XUAS-IVS-dTrpA1 (attP18)*; *10XUAS-dTrpA1 (attP16)* (Hamada et al., 2008); *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire^{ts1}-p10 (VK00005)* (Pfeiffer et al., 2012); *UAS-Shi x1* was generated in Thomas Preat's lab by segregating one of the multiple insertions found in the lines described by (Kitamoto, 2001).

To compare the expression levels driven by split-GAL4 drivers in specific cell types, 3–7 days post-eclosion female brains were dissected, antibody-stained, mounted and imaged at 20× under identical conditions (see the accompanying manuscript for details) (Aso et al., 2014). The relative expression levels in individual cell types are presented as a 0–5 unit gray scale based on the intensity of the signals

Table 2. Split GAL4 drivers for MBONs

Driver	Cell types	p65ADZp DNA	ZpGdbd DNA
MB002B	(MBON- γ 5 β '2a), MBON- β '2mp	R12C11	R14C08
MB011B	MBON- γ 5 β '2a, MBON- β '2mp, MBON- β '2mp_bilateral	R14C08	R15B01
MB018B	MBON- α '2	R20G03	R19F09
MB027B	MBON- α '3m, MBON- α '3ap	R24H08	R53F03
MB050B	MBON- α 2sc, MBON- α '1	R65B09	R11F03
MB051B	MBON- γ 2 α '1, (MBON- α '2)	R70B10	R19F09
MB052B	MBON- α 2sc, (MBON- α 2p3p), (MBON- α '3m), MBON- α '3ap, MBON- α '1	R71D08	R11F03
MB057B	MBON- β '1	R80G12	R53H03
MB077B	MBON- γ 2 α '1	R25D01	R19F09
MB077C	MBON- γ 2 α '1	R25D01	R19F09
MB082C	MBON- α 3, MBON- α '2	R40B08	R23C06
MB083C	MBON- γ 3, MBON- γ 3 β '1	R52G04	R94B10
MB085C	MBON- γ 1pedc> α/β	R52H01	R52B07
MB090C	MBON- γ 2 α '1, (MBON- α '2)	R73H08	R19F09
MB091C	MBON- α '2	R73H08	R20G04
MB093C	MBON- α 3, (MBON- α '2)	R73H08	R40B08
MB110C	MBON- γ 3, MBON- γ 3 β '1	R20A02	R94B10
MB112C	MBON- γ 1pedc> α/β	R93D10	R13F04
MB210B	MBON- γ 5 β '2a, MBON- β '2mp, (MBON- β '2mp_bilateral)	R15B01	R27G01
MB242A	MBON-calyx	R64F07	R57C10
MB262B	MBON- γ 1pedc> α/β	R52B07	R52H01
MB298B	MBON- γ 4> γ 1 γ 2	R53C03	R24E12
MB310C	MBON- α 1	R52G04	R17C11
MB399B	MBON- β 2 β '2a	R21D02	R22C12
MB433B	(MBON- γ 4> γ 1 γ 2), MBON- β 1> α	R30E08	R11C07
MB434B	MBON- γ 4> γ 1 γ 2, MBON- β 1> α	R30E08	R53C10
MB438B	PPL1- γ 1pedc, (PPL1- α 2 α '2)	R30E11	R22B12
MB542B	MBON- α 2p3p, (MBON- α '3m), MBON- α '1	R65B09	R51D04
MB543B	MBON- α '3m, (MBON- α '3ap), MBON- α '1	R65B09	R81E11
MB549C	MBON- α 2sc, MBON- α '3ap	R71D08	R49C12
MB622B	MBON-calyx	R64F07	R64F07

For each of 31 driver lines used in this study, the MBON cell types in which expression is seen as well as the enhancer fragments used for the activation domain (p65ADZp) and DNA binding domain (ZpGAL4DBD) hemi-driver constructs are given. All ZpGAL4DBD constructs were inserted in attP2. The insertion sites of the p65ADZp constructs are indicated by the letter at the end of the driver name as follows: A, *su(Hw)attP8*; B, *attP40*; C, *VK00027*. The cell types shown in brackets indicate expression in those cells was weak, stochastic or was only observed with a subset of UAS-reporters.

DOI: [10.7554/eLife.04580.036](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.036)

in the dendrites obtained for each cell type in each split-GAL4 line. The signal intensity depends on the morphology of individual cell types as well as how many cells of the same cell type innervate the same compartment; thus comparing intensities across cell types is less accurate than the comparisons between lines for the same cell type.

Since the purpose of obtaining these data was to estimate the expression levels of the UAS-effectors used to manipulate cell function, and expression levels are known to vary with genomic insertion site (Pfeiffer *et al.*, 2010), we sought to collect expression data using UAS-indicator lines inserted into

the same genomic location as the effectors. We believe that this practice addresses a potential weakness in many prior studies where expression patterns have been determined with an indicator construct inserted in one chromosomal site, while perturbing function with an effector residing at another site. The lack of precise correlation between the expression pattern of the indicator and effector introduces significant uncertainty. The best practice would be to directly measure the expression of the effector protein itself, something we were able to do for the red-shifted channel rhodopsin CsChrimson-mVenus (*Klapoetke et al., 2014*) by staining for mVenus. The next best approach is to have the indicator of expression and the effector inserted at the same chromosomal location, which we were able to achieve for all cases except the assays of the 2 hr aversive and appetitive odor memory which used a weaker UAS-Shibire effector based on a P-element insertion. We used the following UAS-indicators for the matrices shown in Figures: **Figure 2B**, *20XUAS-CsChrimson-mVenus (attP18)* reared at 22°C; **Figures 7B, 9B, 10B, 11B**, *pJFRC2-10XUAS-IVS-mCD8::GFP (VK00005)* reared at 18°C [similar expression was observed with *pJFRC225-5xUAS-IVS-myr::smGFP-FLAG (VK00005)* reared at 25°C]; **Figure 12B**, *pJFRC200-10xUAS-IVS-myr::smGFP-HA (attP18)* reared at 22°C. Full confocal stacks of these images are available at www.janelia.org/split-gal4.

We used a set of highly specific GAL4 drivers, made using the split-GAL4 intersectoral approach (*Aso et al., 2014*). These drivers have much more restricted expression patterns than those previously used, allowing greater certainty in assigning the effects of perturbations to specific cells. Even with these improved GAL4 drivers, there can be significant variation in expression levels between drivers or in different cell types within the expression pattern of a single driver, as well as off-target expression and variations in genetic background. To assign a function to a cell population, we therefore required that the effects of a manipulation be observed using two different GAL4 drivers for that cell population. In cases where we only had one split-GAL4 driver for a cell type, we believe it is only appropriate to interpret an observed phenotype as suggestive, except in cases where we were confirming a previously published result. Finally, we interpret some results as simply raising the possibility of a role for a cell type. For example, where one GAL4 line resulted in a significant effect, but a second line with a very similar expression pattern did not. There were also cases where we saw a consistent tendency in multiple lines, but where none of the individual lines themselves reached statistical significance.

Detailed methods for immunohistochemistry and image analysis are described in the accompanying manuscript (*Aso et al., 2014*). For the data in **Figure 6—figure supplement 1B**, rabbit anti-GABA (1:500; A2052, Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103) was used.

Assessing innate behaviors

We asked if using the split-GAL4 lines to activate or inactivate neurons would perturb general innate behaviors, such as locomotion and visual perception that might interfere with our assays of memory, locomotion and sleep. Given the results of these tests, we selected 23 split-GAL4 lines for use in the primary behavioral screening of the MBONs and additional lines to confirm the results of primary screening (see **Table 1**). We also performed behavioral assays to verify that the animals carrying the driver line and effector were able to perceive odors, electric shocks and sugar rewards (see Results). Thus, the behavioral phenotypes we observed in these lines are unlikely to result from general defects in innate behaviors.

We first screened 27 MBON split-GAL4 driver lines, crossed to a multi-insert UAS-Shibire^{ts1} effector line (*UAS-Shi^{ts1}* on the third chromosome) (*Kitamoto, 2001*) at 34°C. 3–7 days old adult males of each genotype were wet starved for 1–4 hr and then were assayed for 22 parameters of basic locomotion in response to startle, optomotor and phototaxis stimuli using an apparatus (Fly Behavioral Olympiad, unpublished) inspired by published assays (*Benzer, 1967; Zhu et al., 2009*). Fourteen split-GAL4 lines showed a difference in one or more parameters from the pBDPGAL4U and these lines were re-screened with *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10 (VK00005) DL* (*Pfeiffer et al., 2012*).

Although some lines had phenotypes in some behavioral categories, none of the output lines showed consistent phenotypes across the two Shibire effectors. All of the lines screened were able to appropriately respond to visual stimuli, showed positive phototaxis towards green and UV light, and were able to walk when MBONs were inactivated with Shibire. Only one line, MB549C, showed a significant reduction in walking speed, though subsequent analysis suggests this reduction in speed was due to the genetic background of that line rather than silencing of MBONs. Thus flies can move and orient themselves when MBONs, and any neurons with off-target expression in these split-GAL4

drivers, are inactivated and the small differences from wild-type would not be expected to significantly affect behavior in the assays we performed that used Shibire as an effector.

We also assayed the behavior of flies from each split-GAL4 driver line in a high-throughput open-field arena described in (Kabra et al., 2013) for 15 min during dTrpA1 activation using 10X UAS-dTRPA1 (*attP16*) (Hamada et al., 2008) at 30°C. We first tracked the body and wing position of the flies (Branson et al., 2009; Kabra et al., 2013), and then automatically annotated 14 social and locomotor behaviors of flies such as walking, chasing, grooming, etc (Supplementary file 1) (Kabra et al., 2013). Although we observed variation of locomotion levels between drivers and their GAL4/+ controls, only one driver, MB052B/dTrpA1, showed an obvious phenotype. This phenotype of MB052B was limited to male flies and presumably attributed to male specific expression in this line; we therefore did not use males of this driver in experiments involving activation.

Optogenetics

The choice assay was performed in a 10 cm diameter and 3 mm high circular arena as previously described (Klapoetke et al., 2014). Flies expressing CsChrimson were allowed to distribute between two dark quadrants and two quadrants illuminated with 617 nm LEDs (Red-Orange LUXEON Rebel LED—122 lm; Luxeon Star LEDs, Brantford, Ontario, Canada). This wavelength efficiently activates neurons expressing CsChrimson (Klapoetke et al., 2014), but was distant enough from the peak absorption spectrum of endogenous rhodopsins that at the light intensity used (34 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$) negligible phototaxis of the control genotype was observed. To maintain a constant temperature, the LED board was placed on a heat sink and air (150 ml/min) was exchanged through holes at the center and four corners of the arena in a similar way as in the previously described olfactometer (Vet et al., 1983). The four quadrants were separated by 1 mm dividers. The bottom of arena consisted of a 3 mm thick diffuser with an IR absorption film (YAG, Laser PVC Film; Edmund optics, Barrington, NJ 08007-1380). The intensity of red light decreased from 34 to 3 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ over a 10 mm gradient extending from the border between light on and off quadrants, as shown in Figure 5A.

Crosses were kept on standard cornmeal food supplemented with retinal (0.2 mM all-*trans*-retinal prior to eclosion and then 0.4 mM) at 22°C at 60% relative humidity in the dark. Groups of approximately twenty 4–10 days post-eclosion females were tested at 25°C at 50% relative humidity in a dark chamber. Videography was performed under reflected IR light using a camera (ROHS 1.3 MP B&W Flea3 USB 3.0 Camera; POINT GREY, Richmond, BC, Canada) with an 800-nm long pass filter (B&W filter; Schneider Optics) at 30 frames per sec, 1024 × 1024 pixel resolution and analyzed using Fiji (Schindelin et al., 2012) or Ctrax (Branson et al., 2009). Statistical comparisons were performed using Prism (Graphpad Inc, La Jolla, CA 92037); Kruskal Wallis One way ANOVA followed by Dunn's post-test for comparison between control and experimental genotype in Figure 2C and Figure 5—figure supplement 1; One way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test for Figures 3G and 4; In Figure 5D, p-values for the exit direction were computed using the test of equal proportions from R (<http://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/stats/html/prop.test.html>) followed by multiple comparisons with the Dunn-Sidak correction. Only data obtained with 20XUAS-CsChrimson-*mVenus* (*attP18*) are shown in this study. Our preliminary results with 5XUAS-CsChrimson-*mVenus* (*attP18*) or 10XUAS-CsChrimson-*mVenus* (*attP18*) indicate that either too weak or too strong expression may result in a failure to observe a phenotype.

Aversive (shock) and appetitive (sucrose) 2-hour odor memory

Behavioral experiments were performed at 60% humidity in dim red light for training and in complete darkness for test. The odors, 3-octanol (OCT; Merck) and 4-methylcyclohexanol (MCH; Sigma–Aldrich) were diluted to 1% and 2%, respectively, in paraffin oil (Sigma–Aldrich). Flies were placed in the apparatus and shifted to the restrictive temperature (32°C) from 30 min prior to the commencement of training until the end the experiment. During the 2-hr period between training and testing, trained flies were kept in a vial with moistened filter paper. The trained flies were then allowed to choose between MCH and OCT for 2 min in a modified transparent T-maze. Odors were placed in cups with 30 mm diameter and delivered at a flow rate of 0.6 l/min per tube. The distribution of the flies was monitored by videography and the preference index was calculated by taking the mean indices of the last 10 s in the 2-min choice period. Half of the trained groups received reinforcement together with the first presented odor and the other half with the second odor to cancel the effect of the order of reinforcement.

For aversive memory, a group of ~50 flies in a training tube alternately received OCT and MCH for 1 min in a constant air stream; twelve 1.5 s 90 V electric shocks spaced over 60 s were paired with one of the odors. In the primary screening using *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) as the effector, flies were raised at 25°C. In the secondary screening using the *UAS-Shi x1* effector, flies were raised at 18°C. Odor avoidance was measured by asking flies to choose between air and either MCH or OCT at the same concentrations used in the memory assay; these odors are aversive to naïve flies. For shock avoidance, flies were asked to choose between two tubes, both with copper grids, but only one electrically active. For appetitive memory, the conditioning protocol was as described previously (Liu *et al.*, 2012). Flies were starved prior to the experiments until ~10% mortality was reached. For sugar attraction, flies are asked to choose between two tubes, one with plain filter paper and one with sugar-embedded paper.

Statistical analyses were performed with Prism5 software (GraphPad). The tested groups that did not violate the assumption of normal distribution (D'Agostino-Pearson test) or homogeneity of variance (Bartlett's test) were analyzed with parametric statistics: one-sample t-test or one-way analysis of variance followed by planned pairwise multiple comparisons (Bonferroni). The significance level for statistical tests was set to 0.05. As some of the data points in **Figure 7B** violated the assumption, non-parametric statistics were applied to the dataset (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple test).

Visual aversive (shock) and appetitive (sucrose) conditioning

The effector-line *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) was used, and all experimental flies were heterozygous (*w⁺/w*) or wild-type (*w⁺/Y*) for *white*. Flies were sorted by genotype under CO₂ anesthesia at least 2 days prior to experiments; each measurement used 30–40 mixed males and females. For appetitive conditioning experiments, 2–4 days post-eclosion flies were starved on moistened filter paper to approximately 20% mortality (Schnaitmann *et al.*, 2010); for aversive conditioning experiments, flies were not starved. Control responses to sugar and shock were measured as described previously (Schnaitmann *et al.*, 2010; Vogt *et al.*, 2014).

Appetitive and aversive conditioning paradigms and behavioral tests were as previously described (Schnaitmann *et al.*, 2013; Vogt *et al.*, 2014). Briefly, conditioned stimuli were presented from below using LEDs with peak wavelengths of 452 nm and 520 nm (Seoul Z-Power RGB LED) or 456 nm and 520 nm (H-HP803NB, and H-HP803PG, 3 W Hexagon Power LEDs, Roithner Lasertechnik, Vienna, Austria), adjusted to 14.1 Cd m⁻² s⁻¹ (blue) and 70.7 Cd m⁻² s⁻¹ (green). Each quadrant of the arena was also equipped with an IR-LED (850 nm) to provide background illumination for videography. For appetitive conditioning, filter paper soaked in 2 M sucrose and subsequently dried was presented as reward (Schnaitmann *et al.*, 2010). For aversive conditioning, a 1 s electric shock (AC 60 V) was applied 12 times in 60 s during CS + presentation using a transparent shock grid made of laser-structured ITO on a glass plate. In both appetitive and aversive conditioning assays, differential training was followed by a binary choice without reinforcement. During the 90 s test period, blue and green light were presented in two diagonally opposite quadrants of the arena and the color choice of flies was recorded from above at 1 frame per second with a CMOS camera (Firefly MV, Point Grey). A preference index for each frame was calculated by subtracting the number of flies on the green quadrants from the number on the blue quadrants, divided by the total number of flies. The difference in average visual stimulus preference between the two groups was used to calculate a performance index. Sugar preference and shock avoidance tests were performed as described previously (Schnaitmann *et al.*, 2010; Vogt *et al.*, 2014).

Statistical analyses were performed with Prism5 software (GraphPad). The groups that did not violate the assumption of normal distribution (Shapiro–Wilk test) or homogeneity of variance (Bartlett's test) were analyzed with parametric statistics: one-way analysis of variance followed by the planned pairwise multiple comparisons (Bonferroni). For data that significantly differed from the normal distribution or did not show homogeneity of variance (Bartlett's test), non-parametric statistics were applied (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple test). The significance level of statistical tests was set to 0.05. Only the most conservative statistical result of multiple pairwise comparisons is indicated.

Aversive (shock) long-term odor memory

For behavioral experiments concerning long-term aversive olfactory memory (LTM), wild type (Canton S) or Split-GAL4 female flies were crossed to either *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) (outcrossed to a Canton S genetic background) or wild type males. Flies were raised on standard

medium containing yeast, cornmeal and agar at 18°C and 60% relative humidity under a 12 hr:12 hr light–dark cycle.

The day before the experiment, 0–2 days post-eclosion flies were transferred to fresh food vials. Flies were trained with five cycles of aversive conditioning spaced by 15 min inter-trial intervals (spaced conditioning) at 25°C. The time course of one cycle of aversive conditioning was as follows: flies were exposed to the first odorant for 1 min while twelve 1.5 s, 60-V electric shocks, separated by 3.5 s, were delivered; after a 45 s rest, flies were exposed to the second odorant for 1 min. Two odorants, 3-octanol and 4-methyl-cyclohexanol, were used alternatively as the conditioned stimulus. For all assays (training, memory test and olfactory acuity), odorants were diluted in mineral oil at a final concentration of 0.36 mM for octanol and 0.325 mM for methyl-cyclohexanol, and were delivered by 0.4 l/min airflow bubbled through odor-containing bottles. Except during conditioning, flies were kept on food and were maintained at 18°C between training and test. The memory test was performed as described in (Tranroy *et al.*, 2011). Flies were allowed to acclimatize to the restrictive (32°C) or permissive (25°C) temperature for 30 min prior to the test. Memory scores are displayed as means \pm SEM.

In a primary screen, each Split-Gal4 line was tested for aversive LTM ($n = 7-10$, except MB093C, $n = 20$). The scores obtained for each line were compared by a two-tailed unpaired t-test to the pool of +/UAS-Shi^{ts} scores ($n > 150$). Due to multiple comparisons, a Benjamini-Hochberg procedure (Benjamini and Hochberg, 1995) was applied to control the false discovery rate with a significance level of 0.05. Putative hits after the primary screen were then re-assayed in comparison with +/UAS-Shi^{ts} and Split-GAL4/+ at both the restrictive and permissive temperatures. In this second set of experiments, the scores from the three genotypes were compared using one-way ANOVA followed by pairwise comparisons by Newman–Keuls posthoc tests. MB052B/Shi showed memory impairment compared to MB052B/+ and +/Shi at the restrictive temperature (ANOVA, $F_{2,33} = 14.84$, $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$ by Newman–Keuls pairwise comparison; $n \geq 9$ for all genotypes) but not at the permissive temperature (ANOVA, $F_{2,24} = 0.95$, $p = 0.40$, $n \geq 8$ for all genotypes).

Memory for ethanol intoxication

Flies were reared at room temperature (22°C–23°C) under ambient light with no constrained light/dark cycle. Split-GAL4 males were crossed to *pJFRC100-20XUAS-TTS-Shibire-ts1-p10* (VK00005) females. A daily control (*pJFRC100 x pBDPGAL4U*) was run alongside all experimental crosses. Split-GAL4/+ crosses were performed at a different time than the original split-GAL4/Shi^{ts} screen and run alongside UAS-Shi^{ts}/+ flies. Thermoactivation of Shi^{ts1} was carried out at 31°C during both the training and test period. For 24-hr memory, flies were kept at 22°C–23°C under ambient room light between training and test.

Odors used were 1:36 (vol:vol) ethyl acetate in mineral oil and 1:36 (vol:vol) iso-amyl alcohol in mineral oil. Choice tests for groups of 30 flies were performed in a Y-maze (each arm 2.5 cm in length and 1.5 cm in diameter). Odors were actively streamed individually through the top arms of the Y at 0.3 l/min. Vials of flies were placed at the lower Y arm and flies climbed up and chose between opposing arms of the Y into 14 ml culture tubes; one arm contained one of the odors and the other arm contained air streamed through mineral oil. The preference index was calculated by the formula: (number of flies in odor vial–number of flies in air vial) / total number of flies. The conditioned preference index was the average of the preference indices in reciprocal trials.

Ethanol conditioning was performed essentially as described in (Kaun *et al.*, 2011). Groups of 30 males were trained in perforated 14 ml culture vials filled with 1 ml of 1% agar and covered with mesh lids. 96 vials of flies were trained simultaneously in two 30 \times 15 \times 15 cm training boxes. Training consisted of a 10 min habituation to the training chamber with air, a 10 min presentation of odor 1 (1:36 odor:mineral oil actively streamed at 2 l/min), then 10 min of odor 2 (1:36 odor:mineral oil actively streamed at 2 l/min), with 60% ethanol. Air flow was matched for CS⁺ and CS[−] experiments, and ethanol was delivered by mixing pure ethanol vapor (1.5 l/min) with humidified air (1.1 l/min) at a specified ratio (Wolf *et al.*, 2002). Reciprocal training was performed to ensure that an inherent preference for either odor did not affect the results. Vials of flies from Group 1 and Group 2 were paired according to placement in the training chamber and tested simultaneously. Flies were tested in the Y-maze described above either 30 min or 24 hr after training. Reciprocal groups were averaged for each $n = 1$.

Statistical analyses were performed using the statistical software JMP 10.0.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC 27513-2414). Each split-GAL4/UAS-Shi^{ts1} cross was run on two separate days and pooled

for a total with $n = 12/\text{group}$. Statistical significance for any split-GAL4 line was determined by performing a Wilcoxon test for each split-GAL4/UAS-Shi^{ts} cross against a pooled control. The pooled control included 12 randomly sampled means from the *pBPDG4U/UAS-Shi^{ts}* daily control. A Benjamini-Hochberg False discovery rate (FDR) test (**Benjamini and Hochberg, 1995**) was performed on the p-values for each Wilcoxon comparison. Lines showing $p < 0.05$ following the FDR test were considered statistically significant. GAL4/+ controls were performed for these significant hits, and Kruskal–Wallis comparisons were made comparing each split-GAL4/UAS-shi^{ts}, split-GAL4/+ and +/UAS-Shi^{ts}. Lines were considered significant hits if they passed the FDR correction, splitGAL4/+ Kruskal–Wallis test and showed no significantly decreased sensitivity for either odor used in the assay.

Sleep

Split-GAL4 flies were crossed to either *10XUAS-dTrpA1 (attP16)* (**Hamada et al., 2008**) or *pJFRC124-20XUAS-IVS-dTrpA1 (attP18)* and maintained at 21–22°C. Virgin female progeny, 3–7 days post-eclosion, ($n = 24\text{--}35$) were placed in 65 mm × 5 mm transparent plastic tubes with standard cornmeal dextrose agar media, placed in a *Drosophila* Activity Monitoring system (Trikinetics) and locomotor activity data were collected in 1-min bins for 7 days. Activity monitors were maintained with a 12 hr:12 hr light–dark cycle at 65% relative humidity. Total 24-hr sleep amounts (daytime plus nighttime sleep) were extracted from the locomotor data as described by (**Donelson et al., 2012**); sleep was defined as 5 min or more of inactivity (**Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000**). Sleep profiles were generated representing average ($n = 24\text{--}32$) sleep (min/30 min) for day 3 (baseline), days 4 and 5 (activation), and day 6 (recovery). In addition to permissive temperature controls, *pBDPGAL4U /dTrpA1* and *split-GAL4/+* were used as genotypic controls for hit detection. For all screen hits, waking activity was calculated as the number of beam crossings/min when the fly was awake; consistent with the assays performed in the Flybowl, none of the lines had discernable locomotor defects. Statistical comparisons between experimental and control genotypes were performed using Prism (Graphpad Inc) by Kruskal Wallis One way ANOVA followed by Dunn's post-test.

Acknowledgements

We thank Sung Soo Kim, TJ Florence, Michael Reiser, Igor Negrashov, Steven Sawtelle, Jinyang Liu for help in establishing the optogenetics apparatus. The Janelia Scientific Computing Software group generated software tools, Brandi Sharp and the Janelia Fly Facility helped in fly husbandry, Susana Tae, Rebecca Vorimo and the FlyLight Project Team performed brain dissections, histological preparations and confocal imaging and Heather Dionne made several molecular constructs. We thank Fabian Stamp and Megan Atkins for assistance in visual learning and optogenetics assays, respectively. We thank Brett Mensh, Joshua T Dudman, Vivek Jayaraman, Larry F Abbott, Daisuke Hattori, Toshide Hige and Glenn Turner for stimulating discussions and for comments on earlier drafts of the manuscript.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Howard Hughes Medical Institute		Yoshinori Aso, Karla R Kaun, Alice A Robie, William J Rowell, Rebecca M Johnston, Teri-T B Ngo, Nan Chen, Wyatt Korff, Ulrike Heberlein, Kristin M Branson, Gerald M Rubin
Howard Hughes Medical Institute	Janelia Visiting Scientist Program	Yoshinori Aso, Divya Sitaraman, Katrin Vogt, Michael N Nitabach, Hiromu Tanimoto
Agence Nationale de la Recherche		Pierre-Yves Plaçais, Thomas Preat

Funder	Grant reference number	Author
Labex MemoLife		Ghislain Belliard-Guérin
Bundesministerium für Bildung und Forschung	Bernstein Focus Neurobiology of Learning 01GQ0932	Hiromu Tanimoto
Max-Planck-Gesellschaft		Hiromu Tanimoto
Deutsche Forschungsgemeinschaft	TA 552/5-1	Hiromu Tanimoto
Japan Society for the Promotion of Science	MEXT/JSPS KAKENHI 25890003, 26120705, 26119503 and 26250001	Hiromu Tanimoto
Naito Foundation		Hiromu Tanimoto
National Institute of Neurological Disorders and Stroke	R01NS055035, R01NS056443, R01NS091070	Michael N Nitabach
National Institute of General Medical Sciences	R01GM098931	Michael N Nitabach

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

YA, Conceived and designed the overall study, conducted optogenetics assays, analyzed and interpreted data, wrote the article; DS, Conducted, analyzed and interpreted assays of sleep regulation; TI, Conducted, analyzed and interpreted assays of short-term olfactory memory; KRK, Conducted, analyzed and interpreted assays of ethanol-reward memory; KV, CS, Conducted, analyzed and interpreted assays of visual memory; GB-G, P-YP, Conducted, analyzed and interpreted assays of long-term olfactory memory; AAR, Conducted, analyzed and interpreted the Flybowl assay; NY, Conducted, analyzed and interpreted the US-substitution experiment for short-term olfactory memory; WJR, Conducted, analyzed, and interpreted assays of the optomotor behavior; RMJ, Prepared samples and acquired confocal images; T-TBN, Conducted optogenetic assays; NC, Conducted sleep regulation assays; WK, Analyzed and interpreted assays of optomotor behavior; MNN, Analyzed and interpreted assays of sleep regulation; UH, Analyzed and interpreted assays of ethanol-reward memory; TP, Analyzed and interpreted assays of long-term olfactory memory; KMB, Analyzed and interpreted the results of the optogenetic and Flybowl assays; HT, Conceived and designed the overall study and analyzed and interpreted assays of short-term olfactory and visual memory; GMR, Conceived and designed the overall study, interpreted data and wrote the article

Author ORCIDs

Wyatt Korff,  <http://orcid.org/0000-0001-8396-1533>

Additional files

Supplementary file

- Supplementary file 1. Significance of behavioral differences for Fly Bowl assay. For each line, we compared the fraction of time the split-GAL4/dTrpA1 line does each of 14 behaviors to two controls: empty GAL4 crossed to dTrpA1 (pBDPGAL4U/dTrpA1) and split-GAL4/+. Each data point corresponds to the fraction of time that all 20 flies in a given video performed the given behavior. The table contains a dash if the behavioral differences to both controls had different signs. Otherwise, we use the Wilcoxon rank-sum test to compare to each control separately, adjust the p-value using the Benjamini-Hochberg correction for controlling the false discovery rate to 0.05, and report the (conservative) maximum adjusted p-value of the comparison to each control. The average number of videos (n) analyzed for each split-GAL4/TrpA1 line was 5.0, for each split-GAL4/+ line was 4.2, and for the pBDPGAL4U/TrpA1 line was 143.

DOI: [10.7554/eLife.04580.037](https://doi.org/10.7554/eLife.04580.037)

References

- Abel R**, Rybak J, Menzel R. 2001. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Comparative Neurology* **437**:363–383. doi: [10.1002/cne.1289](https://doi.org/10.1002/cne.1289).
- Akmal DB**, Yu D, Davis RL. 2010. A late-phase, long-term memory trace forms in the gamma neurons of *Drosophila* mushroom bodies after olfactory classical conditioning. *The Journal of Neuroscience* **30**:16699–16708. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1882-10.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1882-10.2010).
- Akmal DB**, Yu D, Davis RL. 2011. The long-term memory trace formed in the *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons is abolished in long-term memory mutants. *The Journal of Neuroscience* **31**:5643–5647. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3190-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3190-10.2011).
- Anderson DJ**, Adolphs R. 2014. A framework for studying emotions across species. *Cell* **157**:187–200. doi: [10.1016/j.cell.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.003).
- Ashburner M**, Misra S, Roote J, Lewis SE, Blazej R, Davis T, Doyle C, Galle R, George R, Harris N, Hartzell G, Harvey D, Hong L, Houston K, Hoskins R, Johnson G, Martin C, Moshrefi A, Palazzolo M, Reese MG, Spradling A, Tsang G, Wan K, Whitelaw K, Celniker S, et al. 1999. An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of *Drosophila melanogaster*: the Adh region. *Genetics* **153**:179–219.
- Aso Y**, Grubel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H. 2009. The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *Journal of Neurogenetics* **23**:156–172. doi: [10.1080/01677060802471718](https://doi.org/10.1080/01677060802471718).
- Aso Y**, Hattori D, Yu Y, Johnston RM, Iyer N, Ngo TB, Dionne H, Abbott LF, Axel R, Tanimoto H, Rubin GM. 2014. The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife* **3**:e04577. doi: [10.7554/eLife.04577](https://doi.org/10.7554/eLife.04577).
- Aso Y**, Herb A, Ogueta M, Siwanowicz I, Templier T, Friedrich AB, Ito K, Scholz H, Tanimoto H. 2012. Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability. *PLOS Genetics* **8**:e1002768. doi: [10.1371/journal.pgen.1002768](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002768).
- Aso Y**, Siwanowicz I, Bräcker L, Ito K, Kitamoto T, Tanimoto H. 2010. Specific dopaminergic neurons for the formation of labile aversive memory. *Current Biology* **20**:1445–1451. doi: [10.1016/j.cub.2010.06.048](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.048).
- Azanchi R**, Kaun KR, Heberlein U. 2013. Competing dopamine neurons drive oviposition choice for ethanol in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**:21153–21158. doi: [10.1073/pnas.1320208110](https://doi.org/10.1073/pnas.1320208110).
- Bang S**, Hyun S, Hong ST, Kang J, Jeong K, Park JJ, Choe J, Chung J. 2011. Dopamine signalling in mushroom bodies regulates temperature-preference behaviour in *Drosophila*. *PLOS Genetics* **7**:e1001346. doi: [10.1371/journal.pgen.1001346](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001346).
- Bath DE**, Stowers JR, Hörmann D, Poehlmann A, Dickson BJ, Straw AD. 2014. FlyMAD: rapid thermogenetic control of neuronal activity in freely walking *Drosophila*. *Nature Methods* **11**:756–762. doi: [10.1038/nmeth.2973](https://doi.org/10.1038/nmeth.2973).
- Benjamini Y**, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate - a Practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**:289–300.
- Benton R**, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB. 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* **136**:149–162. doi: [10.1016/j.cell.2008.12.001](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.001).
- Benzer S**. 1967. BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **58**:1112–1119. doi: [10.1073/pnas.58.3.1112](https://doi.org/10.1073/pnas.58.3.1112).
- Berry JA**, Cervantes-Sandoval I, Nicholas EP, Davis RL. 2012. Dopamine is required for learning and forgetting in *Drosophila*. *Neuron* **74**:530–542. doi: [10.1016/j.neuron.2012.04.007](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.007).
- Bidaye SS**, Machacek C, Wu Y, Dickson BJ. 2014. Neuronal control of *Drosophila* walking direction. *Science* **344**:97–101. doi: [10.1126/science.1249964](https://doi.org/10.1126/science.1249964).
- Blum AL**, Li W, Cressy M, Dubnau J. 2009. Short- and long-term memory in *Drosophila* require cAMP signaling in distinct neuron types. *Current Biology* **19**:1341–1350. doi: [10.1016/j.cub.2009.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.016).
- Bracker LB**, Siju KP, Varela N, Aso Y, Zhang M, Hein I, Vasconcelos ML, Grunwald Kadow IC. 2013. Essential role of the mushroom body in context-dependent CO(2) avoidance in *Drosophila*. *Current Biology* **23**:1228–1234. doi: [10.1016/j.cub.2013.05.029](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.029).
- Branson K**, Robie AA, Bender J, Perona P, Dickinson MH. 2009. High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nature Methods* **6**:451–457. doi: [10.1038/nmeth.1328](https://doi.org/10.1038/nmeth.1328).
- Brembs B**. 2009. Mushroom bodies regulate habit formation in *Drosophila*. *Current Biology* **19**:1351–1355. doi: [10.1016/j.cub.2009.06.014](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.014).
- Burke CJ**, Huetteroth W, Oswald D, Perisse E, Krashes MJ, Das G, Gohl D, Silies M, Certel S, Waddell S. 2012. Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* **492**:433–437. doi: [10.1038/nature11614](https://doi.org/10.1038/nature11614).
- Caron SJ**, Ruta V, Abbott LF, Axel R. 2013. Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* **497**:113–117. doi: [10.1038/nature12063](https://doi.org/10.1038/nature12063).
- Cassenaer S**, Laurent G. 2007. Hebbian STDP in mushroom bodies facilitates the synchronous flow of olfactory information in locusts. *Nature* **448**:709–713. doi: [10.1038/nature05973](https://doi.org/10.1038/nature05973).
- Cassenaer S**, Laurent G. 2012. Conditional modulation of spike-timing-dependent plasticity for olfactory learning. *Nature* **482**:47–52. doi: [10.1038/nature10776](https://doi.org/10.1038/nature10776).
- Cervantes-Sandoval I**, Martin-Pena A, Berry JA, Davis RL. 2013. System-like consolidation of olfactory memories in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **33**:9846–9854. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0451-13.2013).
- Choi GB**, Stettler DD, Kallman BR, Bhaskar ST, Fleischmann A, Axel R. 2011. Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. *Cell* **146**:1004–1015. doi: [10.1016/j.cell.2011.07.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.041).

- Claridge-Chang A**, Roorda RD, Vrontou E, Sjulson L, Li H, Hirsh J, Miesenböck G. 2009. Writing memories with light-addressable reinforcement circuitry. *Cell* **139**:405–415. doi: [10.1016/j.cell.2009.08.034](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.034).
- Comas D**, Petit F, Preat T. 2004. Drosophila long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* **430**:460–463. doi: [10.1038/nature02726](https://doi.org/10.1038/nature02726).
- Crittenden JR**, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D, Davis RL. 1998. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learning & Memory* **5**:38–51.
- Das G**, Klappenbach M, Vrontou E, Perisse E, Clark CM, Burke CJ, Waddell S. 2014. Drosophila learn opposing components of a compound food stimulus. *Current Biology* **24**:1723–1730. doi: [10.1016/j.cub.2014.05.078](https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.078).
- Davis RL**. 2005. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annual Review of Neuroscience* **28**:275–302. doi: [10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135651).
- de Belle JS**, Heisenberg M. 1994. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**:692–695. doi: [10.1126/science.8303280](https://doi.org/10.1126/science.8303280).
- Donelson NC**, Kim EZ, Slawson JB, Vecsey CG, Huber R, Griffith LC. 2012. High-resolution positional tracking for long-term analysis of *Drosophila* sleep and locomotion using the “tracker” program. *PLOS ONE* **7**:e37250. doi: [10.1371/journal.pone.0037250](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037250).
- Donlea JM**, Thimman MS, Suzuki Y, Gottschalk L, Shaw PJ. 2011. Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in *Drosophila*. *Science* **332**:1571–1576. doi: [10.1126/science.1202249](https://doi.org/10.1126/science.1202249).
- Dubnau J**, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, Mcneil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T. 2003. The stufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Current Biology* **13**:286–296. doi: [10.1016/S0960-9822\(03\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00064-2).
- Dubnau J**, Grady L, Kitamoto T, Tully T. 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* **411**:476–480. doi: [10.1038/35078077](https://doi.org/10.1038/35078077).
- Dudai Y**, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S. 1976. dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **73**:1684–1688. doi: [10.1073/pnas.73.5.1684](https://doi.org/10.1073/pnas.73.5.1684).
- Dunipace L**, Meister S, McNealy C, Amrein H. 2001. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Current Biology* **11**:822–835. doi: [10.1016/S0960-9822\(01\)00258-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00258-5).
- Farris SM**. 2011. Are mushroom bodies cerebellum-like structures? *Arthropod Structure & Development* **40**:368–379. doi: [10.1016/j.asd.2011.02.004](https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.02.004).
- Fishilevich E**, Vosshall LB. 2005. Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Current Biology* **15**:1548–1553. doi: [10.1016/j.cub.2005.07.066](https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.066).
- Fleischmann I**, Cotton B, Choffat Y, Spengler M, Kubli E. 2001. Mushroom bodies and post-mating behaviors of *Drosophila melanogaster* females. *Journal of Neurogenetics* **15**:117–144. doi: [10.3109/01677060109066198](https://doi.org/10.3109/01677060109066198).
- Folkers E**, Drain P, Quinn WG. 1993. Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **90**:8123–8127. doi: [10.1073/pnas.90.17.8123](https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8123).
- Ganguly-Fitzgerald I**, Donlea J, Shaw PJ. 2006. Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science* **313**:1775–1781. doi: [10.1126/science.1130408](https://doi.org/10.1126/science.1130408).
- Gerber B**, Tanimoto H, Heisenberg M. 2004. An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Current Opinion in Neurobiology* **14**:737–744. doi: [10.1016/j.conb.2004.10.014](https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.10.014).
- Gervasi N**, Tchénio P, Preat T. 2010. PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* **65**:516–529. doi: [10.1016/j.neuron.2010.01.014](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.014).
- Griffith LC**. 2012. Identifying behavioral circuits in *Drosophila melanogaster*: moving targets in a flying insect. *Current Opinion in Neurobiology* **22**:609–614. doi: [10.1016/j.conb.2012.01.002](https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.01.002).
- Hamada FN**, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, Garrity PA. 2008. An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* **454**:217–220. doi: [10.1038/nature07001](https://doi.org/10.1038/nature07001).
- Hanesch U**, Fischbach KF, Heisenberg M. 1989. Neuronal architecture of the Central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research* **257**:343–366. doi: [10.1007/BF00261838](https://doi.org/10.1007/BF00261838).
- Heisenberg M**, Borst A, Wagner S, Byers D. 1985. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of Neurogenetics* **2**:1–30. doi: [10.3109/01677068509100140](https://doi.org/10.3109/01677068509100140).
- Hendricks JC**, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA, Sehgal A, Pack AI. 2000. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* **25**:129–138. doi: [10.1016/S0896-6273\(00\)80877-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80877-6).
- Hendricks JC**, Sehgal A. 2004. Why a fly? Using *Drosophila* to understand the genetics of circadian rhythms and sleep. *Sleep* **27**:334–342.
- Hirano Y**, Saitoe M. 2013. Hunger and memory; CRTG coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. *Communicative & Integrative Biology* **6**:e25152. doi: [10.4161/cib.25152](https://doi.org/10.4161/cib.25152).
- Hong ST**, Bang S, Hyun S, Kang J, Jeong K, Paik D, Chung J, Kim J. 2008. cAMP signalling in mushroom bodies modulates temperature preference behaviour in *Drosophila*. *Nature* **454**:771–775. doi: [10.1038/nature07090](https://doi.org/10.1038/nature07090).
- Huang C**, Zheng X, Zhao H, Li M, Wang P, Xie Z, Wang L, Zhong Y. 2012. A permissive role of mushroom body alpha/beta core neurons in long-term memory consolidation in *Drosophila*. *Current Biology* **22**:1981–1989. doi: [10.1016/j.cub.2012.08.048](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.048).
- Isabel G**, Pascual A, Preat T. 2004. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* **304**:1024–1027. doi: [10.1126/science.1094932](https://doi.org/10.1126/science.1094932).
- Ito M**, Masuda N, Shinomiya K, Endo K, Ito K. 2013. Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the *Drosophila* brain. *Current Biology* **23**:644–655. doi: [10.1016/j.cub.2013.03.015](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.015).
- Ito M**, Sakurai M, Tongroach P. 1982. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Physiology* **324**:113–134.

- Jan LY, Jan YN. 1976. L-glutamate as an excitatory transmitter at *Drosophila* Larval Neuromuscular-Junction. *Journal of Physiology* **262**:215–236.
- Jefferis GS, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlfling T, Maurer CR Jnr, Luo L. 2007. Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* **128**:1187–1203. doi: [10.1016/j.cell.2007.01.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.040).
- Joiner WJ, Crocker A, White BH, Sehgal A. 2006. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* **441**:757–760. doi: [10.1038/nature04811](https://doi.org/10.1038/nature04811).
- Kabra M, Robie AA, Rivera-Alba M, Branson S, Branson K. 2013. JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nature Methods* **10**:64–67. doi: [10.1038/nmeth.2281](https://doi.org/10.1038/nmeth.2281).
- Kaun KR, Azanchi R, Maung Z, Hirsh J, Heberlein U. 2011. A *Drosophila* model for alcohol reward. *Nature Neuroscience* **14**:612–619. doi: [10.1038/nn.2805](https://doi.org/10.1038/nn.2805).
- Kepecs A, Uchida N, Zariwala HA, Mainen ZF. 2008. Neural correlates, computation and behavioural impact of decision confidence. *Nature* **455**:227–231. doi: [10.1038/nature07200](https://doi.org/10.1038/nature07200).
- Kiani R, Shadlen MN. 2009. Representation of confidence associated with a decision by neurons in the parietal cortex. *Science* **324**:759–764. doi: [10.1126/science.1169405](https://doi.org/10.1126/science.1169405).
- Kim YC, Lee HG, Han KA. 2007. D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **27**:7640–7647. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007).
- Kitamoto T. 2001. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of Neurobiology* **47**:81–92. doi: [10.1002/neu.1018](https://doi.org/10.1002/neu.1018).
- Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, Morimoto TK, Chuong AS, Carpenter EJ, Tian ZJ, Wang J, Xie YL, Yan ZX, Zhang Y, Chow BY, Surek B, Melkonian M, Jayaraman V, Constantine-Paton M, Wong GK, Boyden ES. 2014. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods* **11**:338–346. doi: [10.1038/nmeth.2836](https://doi.org/10.1038/nmeth.2836).
- Knapik S, Kahsai L, Winther AM, Tanimoto H, Nässel DR. 2013. Short neuropeptide F acts as a functional neuromodulator for olfactory memory in Kenyon cells of *Drosophila* mushroom bodies. *The Journal of Neuroscience* **33**:5340–5345. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2287-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2287-12.2013).
- Knapik S, Sigrist S, Tanimoto H. 2011. Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *The Journal of Neuroscience* **31**:3453–3458. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2585-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2585-10.2011).
- Krashes MJ, Dasgupta S, Vreede A, White B, Armstrong JD, Waddell S. 2009. A neural circuit mechanism integrating Motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* **139**:416–427. doi: [10.1016/j.cell.2009.08.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.035).
- Krashes MJ, Keene AC, Leung B, Armstrong JD, Waddell S. 2007. Sequential use of mushroom body neuron subsets during *Drosophila* odor memory processing. *Neuron* **53**:103–115. doi: [10.1016/j.neuron.2006.11.021](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.021).
- Krashes MJ, Waddell S. 2008. Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **28**:3103–3113. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5333-07.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5333-07.2008).
- Laurent G. 2002. Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nature Reviews Neuroscience* **3**:884–895. doi: [10.1038/nrn964](https://doi.org/10.1038/nrn964).
- Laurent G, Naraghi M. 1994. Odorant-induced oscillations in the mushroom bodies of the locust. *The Journal of Neuroscience* **14**:2993–3004.
- Levy I, Snell J, Nelson AJ, Rustichini A, Glimcher PW. 2010. Neural representation of subjective value under risk and ambiguity. *Journal of Neurophysiology* **103**:1036–1047. doi: [10.1152/jn.00853.2009](https://doi.org/10.1152/jn.00853.2009).
- Lin HH, Lai JS, Chin AL, Chen YC, Chiang AS. 2007. A map of olfactory representation in the *Drosophila* mushroom body. *Cell* **128**:1205–1217. doi: [10.1016/j.cell.2007.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.006).
- Liu C, Placais PY, Yamagata N, Pfeiffer BD, Aso Y, Friedrich AB, Siwanowicz I, Rubin GM, Preat T, Tanimoto H. 2012. A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature* **488**:512–516. doi: [10.1038/nature11304](https://doi.org/10.1038/nature11304).
- Liu G, Seiler H, Wen A, Zars T, Ito K, Wolf R, Heisenberg M, Liu L. 2006. Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* **439**:551–556. doi: [10.1038/nature04381](https://doi.org/10.1038/nature04381).
- Liu L, Wolf R, Ernst R, Heisenberg M. 1999. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* **400**:753–756. doi: [10.1038/22919](https://doi.org/10.1038/22919).
- Liu WW, Wilson RI. 2013. Glutamate is an inhibitory neurotransmitter in the *Drosophila* olfactory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**:10294–10299. doi: [10.1073/pnas.1220560110](https://doi.org/10.1073/pnas.1220560110).
- Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG. 1984. Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* **37**:205–215. doi: [10.1016/0092-8674\(84\)90316-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90316-7).
- Mao Z, Davis RL. 2009. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits* **3**:5. doi: [10.3389/neuro.04.005.2009](https://doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009).
- Marin EC, Jefferis GS, Komiyama T, Zhu H, Luo L. 2002. Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* **109**:243–255. doi: [10.1016/S0092-8674\(02\)00700-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00700-6).
- Martin JR, Ernst R, Heisenberg M. 1998. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning & Memory* **5**:179–191.
- Masek P, Scott K. 2010. Limited taste discrimination in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **107**:14833–14838. doi: [10.1073/pnas.1009318107](https://doi.org/10.1073/pnas.1009318107).
- Mcbride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, Baker G, Siwicki KK. 1999. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* **24**:967–977. doi: [10.1016/S0896-6273\(00\)81043-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81043-0).

- McGuire SE**, Le PT, Davis RL. 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* **293**:1330–1333. doi: [10.1126/science.1062622](https://doi.org/10.1126/science.1062622).
- McGuire SE**, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL. 2003. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**:1765–1768. doi: [10.1126/science.1089035](https://doi.org/10.1126/science.1089035).
- Miyashita T**, Oda Y, Horiuchi J, Yin JC, Morimoto T, Saitoe M. 2012. Mg(2+) block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron* **74**:887–898. doi: [10.1016/j.neuron.2012.03.039](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.039).
- Murthy M**, Fiete I, Laurent G. 2008. Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* **59**:1009–1023. doi: [10.1016/j.neuron.2008.07.040](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.040).
- Okada R**, Rybak J, Manz G, Menzel R. 2007. Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *The Journal of Neuroscience* **27**:11736–11747. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2216-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2216-07.2007).
- Pai TP**, Chen CC, Lin HH, Chin AL, Lai JS, Lee PT, Tully T, Chiang AS. 2013. *Drosophila* ORB protein in two mushroom body output neurons is necessary for long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **110**:7898–7903. doi: [10.1073/pnas.1216336110](https://doi.org/10.1073/pnas.1216336110).
- Parisky KM**, Agosto J, Pulver SR, Shang Y, Kuklin E, Hodge JJ, Kang K, Liu X, Garrity PA, Rosbash M, Griffith LC. 2008. PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* **60**:672–682. doi: [10.1016/j.neuron.2008.10.042](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.042).
- Pascual A**, Pr at T. 2001. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* **294**:1115–1117. doi: [10.1126/science.1064200](https://doi.org/10.1126/science.1064200).
- Perez-Orive J**, Mazor O, Turner GC, Cassenaer S, Wilson RI, Laurent G. 2002. Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* **297**:359–365. doi: [10.1126/science.1070502](https://doi.org/10.1126/science.1070502).
- Perisse E**, Yin Y, Lin AC, Lin S, Huetteroth W, Waddell S. 2013. Different kenyon cell populations drive learned approach and avoidance in *Drosophila*. *Neuron* **79**:945–956. doi: [10.1016/j.neuron.2013.07.045](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.045).
- Pfeiffer BD**, Ngo TT, Hibbard KL, Murphy C, Jenett A, Truman JW, Rubin GM. 2010. Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **186**:735–755. doi: [10.1534/genetics.110.119917](https://doi.org/10.1534/genetics.110.119917).
- Pfeiffer BD**, Truman JW, Rubin GM. 2012. Using translational enhancers to increase transgene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **109**:6626–6631. doi: [10.1073/pnas.1204520109](https://doi.org/10.1073/pnas.1204520109).
- Pitman JL**, Huetteroth W, Burke CJ, Krashes MJ, Lai SL, Lee T, Waddell S. 2011. A pair of inhibitory neurons are required to sustain labile memory in the *Drosophila* mushroom body. *Current Biology* **21**:855–861. doi: [10.1016/j.cub.2011.03.069](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.069).
- Pitman JL**, McGill JJ, Keegan KP, Allada R. 2006. A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* **441**:753–756. doi: [10.1038/nature04739](https://doi.org/10.1038/nature04739).
- Placais PY**, Preat T. 2013. To favor survival under food shortage, the brain disables costly memory. *Science* **339**:440–442. doi: [10.1126/science.1226018](https://doi.org/10.1126/science.1226018).
- Placais PY**, Trannoy S, Friedrich AB, Tanimoto H, Preat T. 2013. Two pairs of mushroom body efferent neurons are required for appetitive long-term memory retrieval in *Drosophila*. *Cell Reports* **5**:769–780. doi: [10.1016/j.celrep.2013.09.032](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.032).
- Placais PY**, Trannoy S, Isabel G, Aso Y, Siwanowicz I, Belliard-Gu erin G, Vernier P, Birman S, Tanimoto H, Preat T. 2012. Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* **15**:592–599. doi: [10.1038/nn.3055](https://doi.org/10.1038/nn.3055).
- Qin H**, Cressy M, Li W, Coravos JS, Izzi SA, Dubnau J. 2012. Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in *Drosophila*. *Current Biology* **22**:608–614. doi: [10.1016/j.cub.2012.02.014](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.014).
- Schindelin J**, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**:676–682. doi: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).
- Schnaitmann C**, Garbers C, Wachtler T, Tanimoto H. 2013. Color discrimination with broadband photoreceptors. *Current Biology* **23**:2375–2382. doi: [10.1016/j.cub.2013.10.037](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.037).
- Schnaitmann C**, Vogt K, Triphan T, Tanimoto H. 2010. Appetitive and aversive visual learning in freely moving *Drosophila*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4**:10. doi: [10.3389/fnbeh.2010.00010](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00010).
- Schroll C**, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, V oller T, Erbguth K, Gerber B, Hendel T, Nagel G, Buchner E, Fiala A. 2006. Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in *Drosophila* larvae. *Current Biology* **16**:1741–1747. doi: [10.1016/j.cub.2006.07.023](https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.023).
- Schurmann FW**. 1974. [On the functional anatomy of the corpora pedunculata in insects (author's transl)]. *Experimental Brain Research* **19**:406–432. doi: [10.1007/BF00234464](https://doi.org/10.1007/BF00234464).
- Schwaerzel M**, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M. 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **23**:10495–10502.
- S ejourn e J**, Placais PY, Aso Y, Siwanowicz I, Trannoy S, Thoma V, Tedjakumala SR, Rubin GM, Tch enio P, Ito K, Isabel G, Tanimoto H, Preat T. 2011. Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* **14**:903–910. doi: [10.1038/nn.2846](https://doi.org/10.1038/nn.2846).
- Shang Y**, Donelson NC, Vecsey CG, Guo F, Rosbash M, Griffith LC. 2013. Short neuropeptide F is a sleep-promoting inhibitory modulator. *Neuron* **80**:171–183. doi: [10.1016/j.neuron.2013.07.029](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.029).
- Shaw PJ**, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. 2000. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**:1834–1837. doi: [10.1126/science.287.5459.1834](https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1834).

- Shen W**, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* **321**:848–851. doi: [10.1126/science.1160575](https://doi.org/10.1126/science.1160575).
- Silbering AF**, Rytz R, Grosjean Y, Abuin L, Ramdya P, Jefferis GS, Benton R. 2011. Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems. *The Journal of Neuroscience* **31**:13357–13375. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2360-11.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2360-11.2011).
- Strauss R**. 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* **12**:633–638. doi: [10.1016/S0959-4388\(02\)00385-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00385-9).
- Suh GS**, Ben-Tabou de Leon S, Tanimoto H, Fiala A, Benzer S, Anderson DJ. 2007. Light activation of an innate olfactory avoidance response in *Drosophila*. *Current Biology* **17**:905–908. doi: [10.1016/j.cub.2007.04.046](https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.046).
- Tanaka NK**, Awasaki T, Shimada T, Ito K. 2004. Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Current Biology* **14**:449–457. doi: [10.1016/j.cub.2004.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.006).
- Tanaka NK**, Endo K, Ito K. 2012. Organization of antennal lobe-associated neurons in adult *Drosophila melanogaster* brain. *The Journal of Comparative Neurology* **520**:4067–4130. doi: [10.1002/cne.23142](https://doi.org/10.1002/cne.23142).
- Tanaka NK**, Tanimoto H, Ito K. 2008. Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of Comparative Neurology* **508**:711–755. doi: [10.1002/cne.21692](https://doi.org/10.1002/cne.21692).
- Tempel BL**, Bonini N, Dawson DR, Quinn WG. 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **80**:1482–1486. doi: [10.1073/pnas.80.5.1482](https://doi.org/10.1073/pnas.80.5.1482).
- Trannoy S**, Redt-Clouet C, Dura JM, Preat T. 2011. Parallel processing of appetitive short- and long-term memories in *Drosophila*. *Current Biology* **21**:1647–1653. doi: [10.1016/j.cub.2011.08.032](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.032).
- Tully T**, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M. 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79**:35–47. doi: [10.1016/0092-8674\(94\)90398-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90398-0).
- Tully T**, Quinn WG. 1985. Classical-conditioning and retention in Normal and mutant *Drosophila-Melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology* **157**:263–277. doi: [10.1007/BF01350033](https://doi.org/10.1007/BF01350033).
- Turner GC**, Bazhenov M, Laurent G. 2008. Olfactory representations by *Drosophila* mushroom body neurons. *Journal of Neurophysiology* **99**:734–746. doi: [10.1152/jn.01283.2007](https://doi.org/10.1152/jn.01283.2007).
- van Swinderen B**, Mccartney A, Kauffman S, Flores K, Agrawal K, Wagner J, Paulk A. 2009. Shared visual attention and memory systems in the *Drosophila* brain. *PLOS ONE* **4**:e5989. doi: [10.1371/journal.pone.0005989](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005989).
- Vasmer D**, Pooryasin A, Riemensperger T, Fiala A. 2014. Induction of aversive learning through thermogenetic activation of Kenyon cell ensembles in *Drosophila*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **8**:174. doi: [10.3389/fnbeh.2014.00174](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00174).
- Venken KJ**, Simpson JH, Bellen HJ. 2011. Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly. *Neuron* **72**:202–230. doi: [10.1016/j.neuron.2011.09.021](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.021).
- Vet LEM**, Vanlenteren JC, Heymans M, Meelis E. 1983. An air-flow olfactometer for measuring olfactory responses of Hymenopterous Parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology* **8**:97–106. doi: [10.1111/j.1365-3032.1983.tb00338.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1983.tb00338.x).
- Vogt K**, Schnaitmann C, Dylla KV, Knapke S, ASO Y, RUBIN GM, Tanimoto H. 2014. Shared mushroom body circuits underlie visual and olfactory memories in *Drosophila*. *eLife* **3**:e02395. doi: [10.7554/eLife.02395](https://doi.org/10.7554/eLife.02395).
- Vosshall LB**, Stocker RF. 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience* **30**:505–533. doi: [10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094306).
- Wolf FW**, Rodan AR, Tsai LT, Heberlein U. 2002. High-resolution analysis of ethanol-induced locomotor stimulation in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **22**:11035–11044.
- Wong AM**, Wang JW, Axel R. 2002. Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell* **109**:229–241. doi: [10.1016/S0092-8674\(02\)00707-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00707-9).
- Wu CL**, Xia S, Fu TF, Wang H, Chen YH, Leong D, Chiang AS, Tully T. 2007. Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nature Neuroscience* **10**:1578–1586. doi: [10.1038/nn2005](https://doi.org/10.1038/nn2005).
- Xia S**, Miyashita T, Fu TF, Lin WY, Wu CL, Pyzocha L, Lin IR, Saitoe M, Tully T, Chiang AS. 2005. NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*. *Current Biology* **15**:603–615. doi: [10.1016/j.cub.2005.02.059](https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.059).
- Yamagata N**, Ichinose T, Aso Y, Plaçais P, Friedrich AB, Sima R, Preat T, Rubin GM, Tanimoto H. In press. Distinct dopamine neurons mediate reward signals for short- and long-term memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. doi: [10.1073/pnas.1421930112](https://doi.org/10.1073/pnas.1421930112).
- Yanike M**, Ferrera VP. 2014. Representation of outcome risk and action in the anterior caudate nucleus. *The Journal of Neuroscience* **34**:3279–3290. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3818-13.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3818-13.2014).
- Yin JC**, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**:49–58. doi: [10.1016/0092-8674\(94\)90399-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90399-9).
- Young JM**, Armstrong JD. 2010a. Building the central complex in *Drosophila*: the generation and development of distinct neural subsets. *The Journal of Comparative Neurology* **518**:1525–1541. doi: [10.1002/cne.22285](https://doi.org/10.1002/cne.22285).
- Young JM**, Armstrong JD. 2010b. Structure of the adult central complex in *Drosophila*: organization of distinct neuronal subsets. *The Journal of Comparative Neurology* **518**:1500–1524. doi: [10.1002/cne.22284](https://doi.org/10.1002/cne.22284).
- Yu D**, Akalal DB, Davis RL. 2006. *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* **52**:845–855. doi: [10.1016/j.neuron.2006.10.030](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.030).
- Yu HH**, Awasaki T, Schroeder MD, Long FH, Yang JS, He YS, Ding P, Kao JC, Wu GYY, Peng HC, Myers G, Lee T. 2013. Clonal development and organization of the adult *Drosophila* central brain. *Current Biology* **23**:633–643. doi: [10.1016/j.cub.2013.02.057](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.057).

- Yu HH**, Kao CF, He Y, Ding P, Kao JC, Lee T. 2010. A complete developmental sequence of a *Drosophila* neuronal lineage as revealed by twin-spot MARCM. *PLoS Biology* **8**:e1000461. doi: [10.1371/journal.pbio.1000461](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000461).
- Zars T**, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M. 2000. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* **288**:672–675. doi: [10.1126/science.288.5466.672](https://doi.org/10.1126/science.288.5466.672).
- Zhang K**, Guo JZ, Peng Y, Xi W, Guo A. 2007. Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science* **316**:1901–1904. doi: [10.1126/science.1137357](https://doi.org/10.1126/science.1137357).
- Zhang X**, Ren Q, Guo A. 2013. Parallel pathways for cross-modal memory retrieval in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **33**:8784–8793. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4631-12.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4631-12.2013).
- Zhu Y**, Nern A, Zipursky SL, Frye MA. 2009. Peripheral visual circuits functionally segregate motion and phototaxis behaviors in the fly. *Current Biology* **19**:613–619. doi: [10.1016/j.cub.2009.02.053](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.053).