



Neuropeptides et néprilysines : rôle dans la mémoire chez la drosophile

Oriane Turrel

► To cite this version:

Oriane Turrel. Neuropeptides et néprilysines : rôle dans la mémoire chez la drosophile. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066274 . tel-02300838

HAL Id: tel-02300838

<https://theses.hal.science/tel-02300838>

Submitted on 30 Sep 2019

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

Laboratoire Plasticité du Cerveau

Equipe Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire

Neuropeptides et Néprilysines : rôle dans la mémoire chez la Drosophile

Thèse de doctorat de Neurosciences

Oriane Turrel

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

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2017, devant un jury composé de :

Pr Emmanuèle Mouchel-Vielh

Dr Alberto Pascual

Dr Marie-Laure Parmentier

Dr Nicolas Gervasi

Dr Hervé Tricoire

Dr Valérie Goguel

Représentante de Paris VI

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

*« La vie n'est facile pour aucun de nous.
Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi.
Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose,
et que cette chose il faut l'atteindre coûte que coûte. »*

Marie Curie

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux : Emmanuèle Mouchel-Vielh, Marie-Laure Parmentier, Nicolas Gervasi, Alberto Pascual et Hervé Tricoire.

Un grand merci à Thomas Préat et Valérie Goguel de m'avoir donné la chance de prouver ma valeur malgré les difficultés rencontrées, puis de m'avoir encouragée pendant ces 4 années passées au laboratoire.

Merci Thomas de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et d'avoir financé ma thèse. Je te remercie d'avoir pris à cœur et de t'être impliqué dans mes projets ainsi que de les avoir guidés. Merci pour ton soutien, les nombreuses discussions scientifiques autour de mes différents projets et ton enthousiasme contagieux pour de nouvelles idées et techniques. Et notamment merci de m'avoir proposé de poursuivre le projet d'imagerie avec conditionnement sous le microscope initié par Mélanie, ce qui m'a offert une expérience très enrichissante à Orsay.

Valérie, merci de m'avoir formée au métier de chercheur et de m'avoir aidée à construire une réflexion scientifique autonome. Ta rigueur, ton soutien et ta confiance ont été une immense force pour me pousser vers l'avant. Merci pour nos nombreux échanges scientifiques et personnels. Tu as toujours su être disponible pour moi quelle que soit la situation. Et merci d'avoir supporté mes envahissantes plantes vertes !

En 4 ans, j'ai pu développer des projets particulièrement intéressants et novateurs. Avoir pu réaliser ma thèse dans un laboratoire offrant autant d'opportunités et de compétences, et maîtrisant des techniques aussi diverses, est une chance immense dont je vous suis extrêmement reconnaissante.

Merci aussi à tous les membres de l'équipe GDSM et du laboratoire Plasticité du Cerveau, aussi bien les membres passés que ceux qui sont restés. Merci aux « anciens » pour m'avoir intégrée à la vie du laboratoire et m'avoir montré les ficelles du métier : Isabelle, PYM, Ghislain, Emna et Eric. Merci aux membres de la cuisine drosophile, sans qui rien ne serait possible : Daniela, Alexandre, Audrey.

Merci en particulier à Honorine, parmi tant d'autres choses merci d'avoir appuyé sur le bouton !! Aurélie, merci pour les discussions, le soutien et les cours de rattrapage sur les dilutions ! Laure pour les rigolades et les bières du soir ; Camille pour les rires et Die Antwoord, Maureen pour toutes nos discussions et le sport ! , Jérémy pour la découverte du

sadisme caché du sport, Lisa pour l'introduction au monde de la recherche allemande, Noé pour ton aide et ton attitude positive, Alexandra pour les nombreuses discussions et tes encouragements, Danaé pour les sorties shopping qui font mal à nos valeurs monétaires.

Enfin, merci à Pascale Gisquet-Verrier pour m'avoir introduite en M1 dans le monde de la recherche scientifique. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir formée à l'expérimentation animale sur les si mignons rats, et aussi merci de m'avoir chaudement encouragée à bien choisir mon stage de M2.

Merci aussi à tous ceux qui m'ont soutenue en dehors du monde de la recherche : mes parents pour tout, ma famille et mes amis pour s'être intéressés autant à mes petites bêtes et m'avoir toujours poussée à avancer, Sarah pour les thés chaï qui font du bien au moral, Juliette pour la compréhension de ce qu'est une thèse, Benjamin pour m'avoir soutenue pendant ces 4 ans et m'avoir tant encouragé.

Finalement, il me faut remercier les drosophiles pour leur participation à mes expériences : ce sont de toutes petites bêtes très utiles et si affectueuses (particulièrement dans le noir dans les salles de comportement).

Sommaire

REMERCIEMENTS	4
INTRODUCTION	12
I. DROSOPHILA MELANOGASTER : UN MODELE POUR L'ETUDE DE LA MEMOIRE.....	12
1) LES ATOUTS DE LA DROSOPHILE	12
2) DES OUTILS GENETIQUES DISPONIBLES ET ESSENTIELS	12
a) Les éléments P : un outil génétique indispensable.....	12
b) Systèmes de transcription reposant sur les protéines Gal4 et Gal80 ^{ts}	13
c) Les RNA interférents permettent de moduler l'expression de gènes d'intérêt	15
d) Imagerie in vivo : de nombreuses sondes disponibles.....	16
3) CONSERVATION ENTRE L'HOMME ET LA DROSOPHILE	17
a) Conservation au niveau de l'organisation du cerveau	17
b) Conservation moléculaire	21
c) Des outils disponibles pour modéliser les maladies humaines	21
4) LA DROSOPHILE PRESENTE 2 VOIES DE MEMOIRE OLFACTIVE PARALLELES ET ANTAGONISTES	22
5) LES CIRCUITS NEURONAUX IMPLIQUES DANS LA VOIE LABILE DE MEMOIRE.....	25
a) Les Corps Pédonculés (Mushroom Body, MB), centre de la mémoire olfactive	25
b) Les neurones Dorsal Paired Medial	26
c) Lien entre les neurones Anterior Paired Lateral et DPM : une interaction permettant la formation de la mémoire labile.....	28
6) GENES IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION CAMP ET DANS LA VOIE DE MEMOIRE 1.....	29
a) Importance et rôle de la voie de signalisation cAMP.....	29
b) L'Adenylate cyclase rutabaga	30
c) Le neuropeptide amnesiac	31
d) La phosphodiesterase dunce (dnc).....	34
e) la PKA : le principal effecteur de l'activité de rutabaga.....	35
f) Les gènes impliqués dans la formation de la LTM : creb, crammer, tequila	35
II. LES TRACES MNESIQUES.....	37
1) QU'EST-CE QU'UNE TRACE MNESIQUE ?	37
a) Définition	37
b) Des outils d'imagerie disponibles.....	37
c) Conditionnement utilisé.....	37
2) LES TRACES SPECIFIQUES DE LA LTM	37

a) Dans le lobe α	37
b) Dans le lobe γ : un résultat controversé	38
3) LES TRACES SPECIFIQUES DE LA MTM	38
a) Dans les neurones DPM.....	38
b) Dans les neurones MB-V2	38
c) Etonnamment aucune trace mnésique associée à la formation de la MTM n'a encore été décrite dans les MB	38
4) UNE TRACE MNESIQUE DE LA STM OBSERVEE DANS LES NEURONES DE PROJECTION DES VOIES OLFACTIVES (DANS LES LOBES ANTENNAIRES)	39
III. ROLES DE L'AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (APP) ET DES PEPTIDES AMYLOÏDES.....	40
1) LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	40
2) APP, UN ACTEUR MAJEUR DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	41
a) APP chez les mammifères	41
b) Maturation de la protéine APP.....	42
c) Les plaques amyloïdes	46
3) LES PEPTIDES AB	46
a) L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	46
b) Les autres hypothèses : vers un rôle physiologique des peptides amyloïdes ?.....	47
c) Les autres rôles déjà connus	48
4) APPL, L'HOMOLOGUE DE HAPP CHEZ LA DROSOPHILE	48
a) Découverte du gène APP-Like	48
b) Des rôles importants dans le transport axonal et le développement.....	49
c) Un rôle dans la mémoire	51
d) Présence de peptides A β chez la drosophile.....	52
IV. NEPRILYSINES : PROTEINES DE DEGRADATION DES PEPTIDES AB.....	54
1) LES NEPRILYSINES DE MAMMIFERES.....	54
2) LES NEPRILYSINES DE DROSOPHILE	56
V. OBJECTIFS DE LA THESE	58
1) LES NEPRILYSINES ONT-ELLES UN ROLE DANS LA MEMOIRE DANS DES CONDITIONS NON PATHOLOGIQUES?.....	58
2) LES PEPTIDES DAB SONT-ILS UNE CIBLE DES NEPRILYSINES POUR LA FORMATION DE LA MEMOIRE CHEZ LA DROSOPHILE ?.....	58
3) AMNESIAC EST-IL REQUIS CHEZ L'ADULTE POUR LA MEMOIRE ?.....	59
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	<u>62</u>
I. ELEVAGE DES DROSOPHILES	62
II. SOUCHES UTILISEES	62

III. COMPORTEMENT	65
1) CROISEMENTS ET ELEVAGE.....	65
2) CONDITIONNEMENT AVERSIF : PREPARATION	65
3) CONDITIONNEMENT OLFACTIVE AVERSIF	66
4) TESTS.....	68
5) SCORES DE MEMOIRE	69
6) CONTROLES.....	69
a) Tests olfactifs	69
b) Tests d'évitement des chocs électriques	69
7) PROTOCOLES SPECIFIQUES POUR ETUDIER CERTAINES FORMES DE MEMOIRE	70
8) ANALYSES STATISTIQUES	70
IV. IMAGERIE NEURONALE IN VIVO	71
1) EXPERIENCES DE PERFUSION.....	72
2) IMAGERIE FRET (ACTIVITE DE LA PKA, RAPPORTEUR AKAR2).....	72
3) IMAGERIE CALCIQUE (RAPPORTEUR GCAMP3)	73
4) ANALYSE DE L'IMAGERIE	73
V. IMMUNOMARQUAGE.....	74
1) ANALYSE DU PATRON GENERE PAR LES PILOTES D'EXPRESSION	74
2) ANALYSE DU DEFAUT DE DEVELOPPEMENT DES DPM	74
VI. BIOLOGIE MOLECULAIRE	75
1) EXTRACTION DES RNA TOTAUX DE TETES DE DROSOPHILES.....	75
2) TRAITEMENT PAR LA DNASE.....	75
3) SYNTHÈSE DE CDNA	75
4) PROTOCOLE DE « POLYMERASE CHAIN REACTION » QUANTITATIVE (QPCR).....	76
5) WESTERN BLOT	77
a) Extraction par fractionnement des protéines	77
b) Western Blot.....	77
RESULTATS.....	80
I. ARTICLE : DROSOPHILA NEPRILYSINS ARE INVOLVED IN MIDDLE-TERM AND LONG-TERM MEMORY	81
INTRODUCTION.....	81
RÉSULTATS PRINCIPAUX.....	81
ARTICLE	82
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES: NEP2 EST IMPLIQUEE DANS LA FORMATION DE LA LTM	95
II. ARTICLE : DROSOPHILA NEPRILYSIN 1 RESCUES THE MEMORY DEFICIT CAUSED BY AMYLOID PEPTIDE	99
INTRODUCTION.....	99

RESULTATS PRINCIPAUX	99
ARTICLE	100
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES :	152
1- L'expression de peptides dA β affecte la MTM.....	152
2- La surexpression d'APPL dans les neurones DPM adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1	153
3- La surexpression de dBACE dans les neurones α/β adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1	154
4- Absence d'interaction entre Nep1 et les peptides amyloïdes humains	156
5- L'inhibition de Nep2 et de Nep3 ne permet pas de mettre en évidence une interaction avec les peptides dA β	158
III. ARTICLE : AMNESIAC IS REQUIRED IN THE DROSOPHILA MUSHROOM BODY FOR COINCIDENCE	
DETECTION AND MEMORY FORMATION	160
INTRODUCTION.....	160
RESULTATS PRINCIPAUX	160
ARTICLE	161
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES : SAUVETAGE INDUCTIBLE DES MUTANTS AMN ^{X8}	215
<u>DISCUSSION</u>	<u>222</u>
I. ROLE DES NEPRILYSINES DANS LA MEMOIRE	222
1) LOCALISATION DES NEPRILYSINES A LA SYNAPSE.....	222
2) IMPORTANCE DE LA DEGRADATION DE NEUROPEPTIDES POUR LA FORMATION DE LA MEMOIRE	223
3) ROLE DE NEP1 DANS LES NEURONES DPM : DEGRADATION DES PEPTIDES DAB	224
II. AMNESIAC.....	226
1) ROLE D'AMN AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES NEURONES DPM	226
2) ROLE D'AMN DANS LES MB POUR LA MEMOIRE CHEZ L'ADULTE	229
3) POUR L'INSTANT AUCUN RECEPTEUR N'A ETE IDENTIFIE POUR AMNESIAC.....	232
III. UN POSSIBLE CIRCUIT POUR LA MTM ET LA LTM ENTRE LES NEURONES DPM ET LES MB IMPLIQUANT LES NEPRILYSINES, APPL ET AMN	233
1) NOUVELLE HYPOTHESE CONCERNANT LES INTERACTIONS ENTRE LES NEURONES DPM ET LES MB	233
2) ROLES POSSIBLES D'APPL COMME LIAISON ENTRE LES NEURONES DPM ET LES MB.....	234
3) INTERACTIONS POTENTIELLES ENTRE LES PROTEINES NEPRILYSINES, APPL ET AMN	235
IV. CONCLUSION GENERALE : UN NOUVEAU MODELE ?	236
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>240</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</u>	<u>254</u>

INTRODUCTION

I. *Drosophila melanogaster* : un modèle pour l'étude de la mémoire

1) Les atouts de la drosophile

La drosophile présente de nombreux atouts qui en font un modèle d'étude de plus en plus utilisé. Les femelles peuvent produire jusqu'à 200 œufs, ce qui permet d'élever un grand nombre d'individus avec un faible coût. Le temps de génération est court : 15 jours à 25°C et 3 semaines à 18°C.

La drosophile est capable de manifester une grande variété de comportements : les rythmes circadiens, le sommeil, la parade nuptiale, l'alimentation, l'agressivité, la navigation en vol, l'apprentissage et la mémoire, par exemple.

Les drosophiles possèdent aussi un système nerveux simplifié (en terme de nombre de cellules et de structures) en comparaison des modèles mammifères, et présentent l'avantage non-négligeable de permettre de développer facilement et rapidement des individus transgéniques grâce à de nombreux outils génétiques.

2) Des outils génétiques disponibles et essentiels

a) Les éléments P : un outil génétique indispensable

Pour introduire des séquences d'intérêt dans le génome de la drosophile, les éléments P non autonomes sont utilisés depuis des années (Spradling and Rubin, 1982). L'élément P défectueux, car n'exprimant pas de transposase, est contenu dans un vecteur possédant une origine de réplication et un gène de résistance à un antibiotique pour permettre son amplification dans des bactéries. Le gène d'intérêt est cloné dans ce vecteur puis injecté avec un plasmide exprimant la transposase P dans des embryons en début de développement. Les drosophiles de 1^{ère} génération sont criblées pour les insertions de l'élément P grâce à un gène d'intérêt « marqueur » (comme les gènes *white*, codant les pigments colorant les yeux, ou *yellow*, codant les pigments de la cuticule) et les transformants ayant une insertion dans les cellules germinales sont croisés pour amplification de la lignée.

b) Systèmes de transcription reposant sur les protéines Gal4 et Gal80^{ts}

Le système Gal4/UAS, initialement exprimé par la levure, est utilisé chez la drosophile pour permettre l'expression d'un gène d'intérêt dont la séquence est clonée en aval de la séquence promotrice reconnue et activée spécifiquement par Gal4 (UAS) (Brand and Perrimon, 1993). Pour cela, des drosophiles exprimant le facteur de transcription Gal4 sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un groupe de neurones d'intérêt (lignée Gal4 ou pilote d'expression), sont croisées avec des drosophiles ayant dans leur génome un gène situé en aval de séquence UAS. Chez la descendance hétérozygote, le facteur de transcription Gal4 se fixe sur l'UAS et active la transcription du transgène (Figure 1).

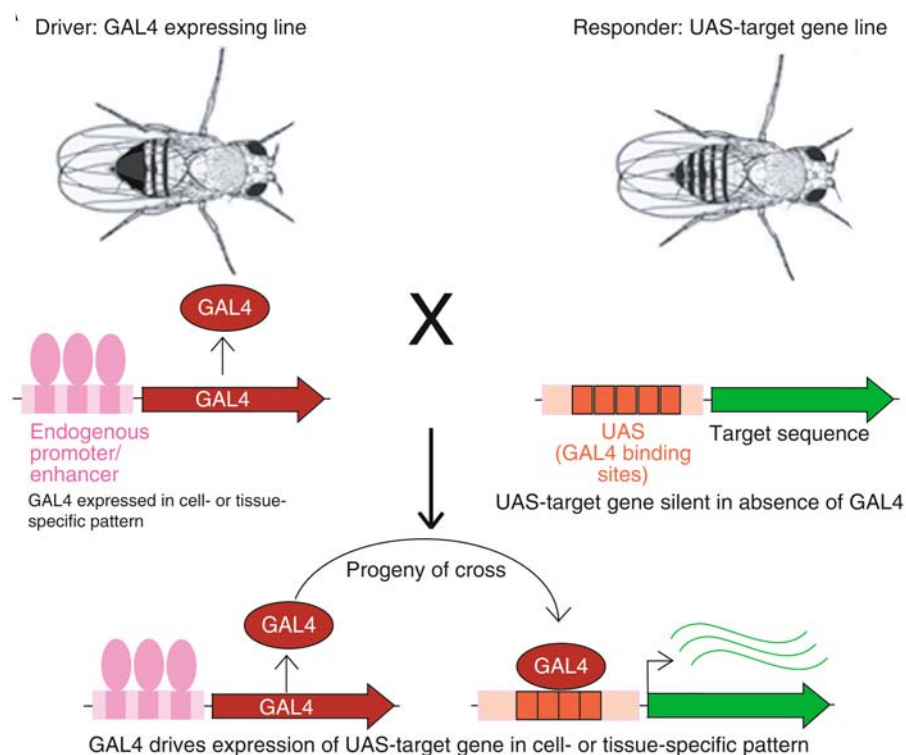


Figure 1 : Le système Gal4/UAS chez la drosophile (Elliott and Brand, 1999).

Des drosophiles « pilotes d'expression », exprimant un Gal4 (en rouge) sous le contrôle d'un promoteur d'expression spécifique d'un ou plusieurs types cellulaires (en rose), sont croisées avec des drosophiles chez lesquelles un transgène (en vert) sous le contrôle d'une séquence promotrice UAS (en orange) a été inséré. Chez la descendance, le Gal4 est exprimé sous le pattern d'expression spécifique et peut se fixer sur les séquences UAS pour exprimer le transgène d'intérêt.

Pour permettre l'induction du transgène, c'est-à-dire son expression à un moment spécifique, les généticiens ont pris avantage du facteur Gal80 de levure. Ce facteur Gal80 permet d'inhiber l'activité de Gal4 : il se fixe à Gal4 et bloque son activité, empêchant ainsi l'expression du transgène (Ma and Ptashne, 1987). Il existe une version modifiée de la protéine Gal80 qui est thermosensible (Gal80^{ts}). Ainsi à température restrictive de 18°C, Gal80^{ts} est fonctionnel et réprime l'activité de transcription de Gal4. A température permissive de 30°C, Gal80^{ts} est dénaturé, ce qui permet au Gal4 d'être actif et d'activer la transcription du transgène (Figure 2, McGuire et al., 2003).

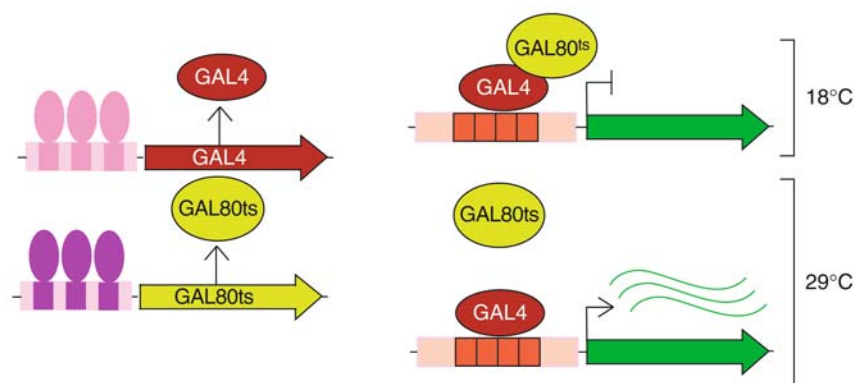


Figure 2 : Le système Gal80ts/Gal4 (Elliott and Brand, 1999).

A 18°C, le facteur de transcription Gal4, exprimé sous un promoteur spécifique, a son activité de transcription bloquée par la fixation du facteur inhibiteur Gal80 modifié pour être thermosensible (Gal80^{ts}). A partir de 29°C, le facteur Gal80^{ts} est dénaturé et ne peut plus se fixer au Gal4, qui peut donc permettre la transcription du transgène d'intérêt.

Au laboratoire, nous effectuons 3 jours d'induction à 30°C pour nos expériences de comportement et dans le cas de test à 24 h les drosophiles sont placées à nouveau à 30°C entre le conditionnement et le test.

L'utilisation du Gal80^{ts} permet l'induction de transgènes à un temps donné. Cela permet de s'affranchir du risque d'observer un phénotype qui serait dû à une anomalie du développement résultant de l'expression du transgène. Il est possible de vérifier que le phénotype observé est bien dû à l'expression du transgène chez l'adulte en étudiant le comportement de ces mouches à température restrictive de 18°C. Enfin, étant donné que l'insertion d'un transgène dans le génome de la drosophile peut perturber l'expression de gènes, l'étude du contrôle génétique +/UAS-transgène permet de vérifier que les phénotypes observés ne sont pas dus à la perturbation de l'expression d'autres gènes.

c) Les RNA interférents permettent de moduler l'expression de gènes d'intérêt

La technique des RNA interférents (RNAi¹) a été décrite dans les années 1990 et provient du système utilisé par la plupart des cellules végétales et animales pour réguler l'expression génétique d'un gène cible (Carthew and Sontheimer, 2009) en dégradant son RNA messager (mRNA).

Les RNA double-brin se trouvant dans le cytoplasme des cellules sont reconnus par la machinerie Dicer et clivés en fragments de 21 à 23 paires de bases ou siRNA (single interferent RNA). Ces siRNA sont reconnus par le complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex). Les deux brins complémentaires des siRNA se dissocient, libérant le brin antisens qui peut alors s'hybrider avec le mRNA complémentaire, induisant ainsi soit sa dégradation, soit un arrêt du processus de traduction (Figure 3).

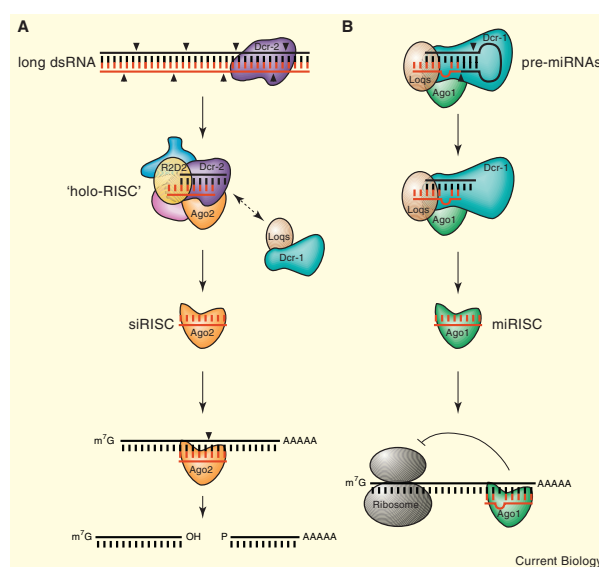


Figure 3 : Modèle des voies Dicer-1 et Dicer-2 chez la drosophile (Leuschner et al., 2005).

A. Dégradation des mRNA. Dicer-2, une RNase III-like, est requise pour cliver les longs dsRNA en duplex de siRNA. Dicer-2 et R2D2 facilitent l'assemblage d'un complexe multi-protéique « holo-RISC » 80S. Après s'être lié à la séquence complémentaire du RNA cible, RISC clive les mRNA cibles. B. Inhibition de la traduction. Un complexe protéique consistant en la RNase III-like Dicer-1, les protéines Loqs et Ago1, peut convertir les pré-miRNA en épingles à cheveux en duplexes de miRNA d'environ 22 nucléotides. Ceux-ci sont placés dans le complexe miRISC, composé d'un seul brin de miRNA lié à Ago1. Ce complexe inhibe la traduction en se liant aux séquences complémentaires dans la région non-transcrite en 3' des mRNA.

¹ Pour des raisons de simplification et de cohérence avec les articles inclus, les abréviations utilisées dans ce manuscrit sont en anglais.

Etant donné qu'un RNAi peut potentiellement se lier à d'autres mRNA, appelés « off-targets », que ceux ciblés, lorsque l'expression d'un RNAi provoque un défaut de mémoire, il est nécessaire d'utiliser une deuxième construction RNAi non chevauchante. Le fait d'utiliser 2 RNAi permet de prouver la spécificité du gène cible.

Lorsqu'un RNAi est exprimé, la diminution de l'expression du gène cible est aléatoire : certains RNAi permettent de peu diminuer la quantité du mRNA cible, alors que d'autres la réduisent beaucoup. Pour renforcer l'effet d'un RNAi il est possible de prendre avantage du système RISC en surexprimant le gène Dicer2 qui code une RNase facilitant l'activation du complexe RISC (Pham et al., 2004). Cela permet d'augmenter l'efficacité des RNAi en augmentant le clivage des siRNA et libérant plus rapidement et en plus grande quantité des RNAi antisens.

Il existe de nombreuses banques de lignées de drosophiles exprimant des transgènes de type UAS-RNAi pour presque tous les gènes de la drosophile : les banques Transgenic RNAi Project (TRiP), Vienna Drosophila Resource Center (VDRC), National Institute of Genetics (NIG)...

d) Imagerie in vivo : de nombreuses sondes disponibles

Il est possible d'étudier l'activité de certaines structures neuronales de la drosophile depuis de nombreuses années. Des molécules fluorescentes répondant à différents types de stimuli (activité calcique, quantité d'une molécule, phosphorylation par une kinase, etc.) sont utilisées, et la fluorescence émise est analysée pour déterminer l'évolution de certains paramètres d'activité. Ces différentes sondes permettent de mesurer de multiples paramètres :

- des sondes calciques : les sondes GCaMP (Tian et al., 2009) ou EPAC, (Colombo et al., 2017),
- des sondes de l'activité de protéine kinase : AKAR pour la PKA (Zhang et al., 2001) ; EKAR pour la MAPK (Harvey et al., 2008) ; CKAR pour la PKC (Goedhart and Gadella, 2009),
- des sondes voltage dépendantes : ArcLight (Jin et al., 2012; Han et al., 2013),
- des sondes pH dépendantes : SpH (Miesenbock et al., 1998),

- des sondes pour certains composés biochimiques : la sonde Pyronic pour le pyruvate par exemple (San Martín et al., 2014 chez les mammifères ; Plaçais et al., 2017 chez la drosophile).

Les plus utilisées sont les sondes de la famille GCaMP qui permettent de mesurer l'activité calcique des neurones. Selon leur nomination, elles disposent de caractéristiques distinctes permettant d'étudier des phénomènes différents tant en temporalité qu'en intensité.

La sonde AKAR, créée en 2001 par Zhang et al. (2001), a été améliorée 4 ans plus tard pour obtenir une augmentation de l'intensité de la réponse et de la sensibilité aux phosphatases afin de délimiter la dynamique de la réponse (Figure 4). Elle permet de mesurer l'activité de la PKA et donc, indirectement, la quantité de cAMP cytoplasmique, puisque la PKA est activée par le cAMP.

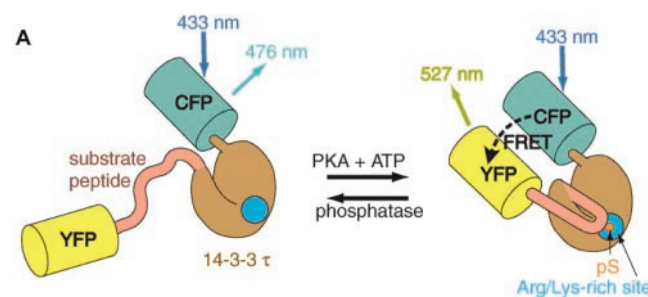


Figure 4 : Schéma de la sonde PKA AKAR (Zhang et al., 2001).

La sonde est basée sur un domaine de liaison à la phosphosérine/thréonine de la levure (14-3-3τ) et un domaine optimisé comme substrat de la PKA. Après phosphorylation par la PKA, le domaine substrat interagit avec la poche de liaison du domaine 14-3-3τ, augmentant le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre 2 variants de la GFP : la CFP (ECFP) et la YFP (citrine). Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux molécules lorsqu'elles sont proches (le donneur et l'accepteur) : seul le donneur reçoit de l'énergie et peut donc renvoyer une onde lumineuse ; en se rapprochant de l'accepteur, le donneur lui transfère son énergie et l'accepteur peut renvoyer sa propre onde lumineuse.

3) Conservation entre l'Homme et la Drosophile

a) Conservation au niveau de l'organisation du cerveau

Le cerveau de la drosophile compte environ 100 000 neurones, contre 1 milliard chez l'Homme (Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008), et est très structuré (Figure 5).

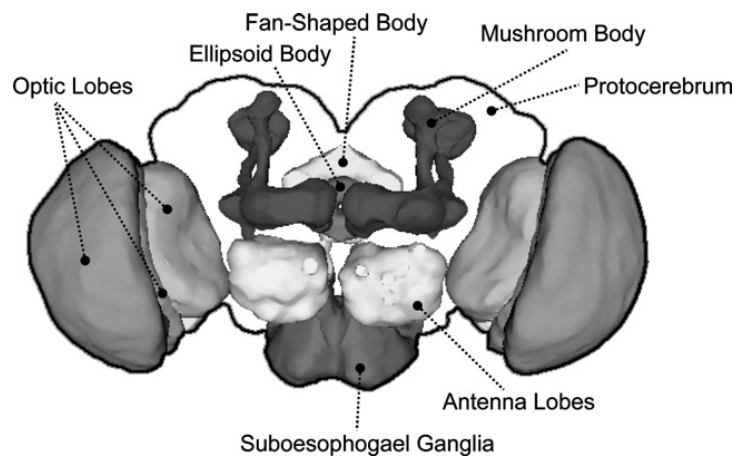


Figure 5 : Schéma du cerveau de la drosophile (Nichols, 2006).

Différentes structures clés du cerveau sont représentées. Les Corps Pédonculés (Mushroom Body, MB) qui sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire ; le corps ellipsoïde (Ellipsoid Body, EB) et le corps en forme d'éventail (Fan-shaped body) du complexe central ; les lobes antennaires impliqués dans l'olfaction ; et le ganglion suboesophagial qui permet la médiation des comportements gustatifs.

Quatre types de cellules gliales, au fonctionnement similaire à celui des cellules gliales de mammifères, sont aussi présents dans le cerveau de drosophile (pour revue, Freeman and Doherty, 2006). Les neurones sont regroupés en structures bien caractérisées, délimitées par des cellules gliales de type « ensheathing glia » similaires aux oligodendrocytes, et sont entourés par des cellules gliales de type astrocytaire (astrocyte-like, Freeman, 2015) qui ont de nombreuses fonctions communes avec les astrocytes de mammifères (recyclage des neurotransmetteurs, modulation de l'activité synaptique par des signaux calciques, etc.). Enfin, le système nerveux est entouré par la glie de surface (périneurale et sub-périneurale) formant la barrière hématoencéphalique et par la glie corticale qui délimite les neuropiles des axones et relie la barrière hématoencéphalique ainsi que les trachées aux neurones, jouant ainsi un rôle similaire à celui des astrocytes (Figure 6).

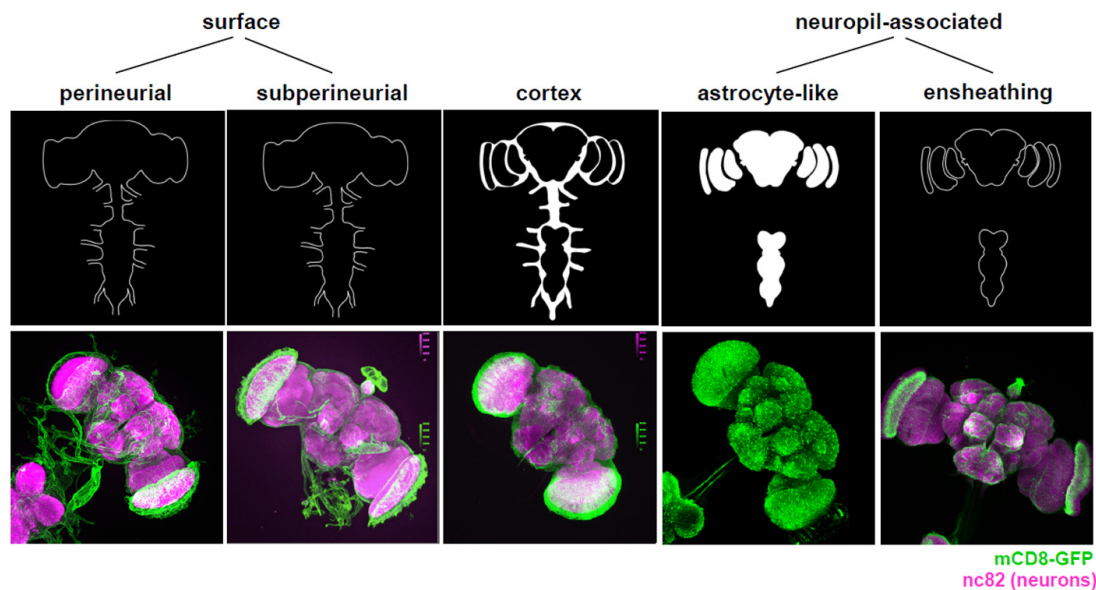


Figure 6 : Les différents types de cellules gliales (<http://www.gaul-lab.genzentrum.lmu.de/glia-function/>).

Les cellules gliales sont indiquées en vert (mCD8-GFP) et les neurones sont indiqués en magenta (marquage de Bruchpilot, marqueur présynaptique). La glie de surface est sous-divisée en deux catégories et entoure le système nerveux en formant la barrière hémato-encéphalique. La glie corticale entoure les différents neuropiles. Les cellules gliales associées aux neuropiles peuvent être divisées en « astrocyte-like », ayant des fonctions similaires aux astrocytes des mammifères, et en « ensheathing glia » qui ont des fonctions similaires aux oligodendrocytes.

De nombreux circuits neuronaux ont été cartographiés et présentent une organisation similaire à celle observée chez l'Homme (Strauss and Heisenberg, 1993; Stocker, 1994; Ito et al., 1998; Tanaka et al., 2008). Concernant l'olfaction, le signal est d'abord perçu au niveau des antennes par les récepteurs olfactifs des neurones sensoriels projetant sur les lobes antennaires. Ces lobes sont organisés en glomérules, permettant une représentation stéréotypée des odeurs. En effet, tous les neurones sensoriels exprimant le même récepteur olfactif projettent sur le même glomérule. Des interneurones locaux permettent de moduler l'information à ce niveau. Le signal est ensuite relayé par des neurones de projection cholinergiques, via le tractus antenno-glomérulaire, jusqu'aux calices des Corps Pédonculés (Mushroom Body, MB), le centre de la mémoire olfactive, et la corne latérale (Lateral Horn) (Figure 7).

Chez les mammifères, l'organisation du circuit olfactif est similaire : l'odeur est perçue au niveau de l'épithélium olfactif par les récepteurs olfactifs des neurones sensoriels projetant sur le bulbe olfactif. Les informations olfactives sont ensuite

transmises par les cellules mitrales au cortex olfactif (pour revue, Imai et al., 2010; Ramdya and Benton, 2010).

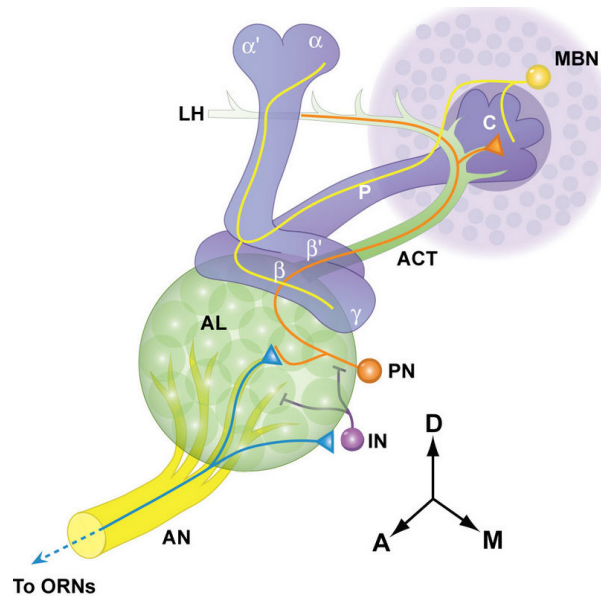


Figure 7 : Schéma simplifié de l'organisation anatomique du système olfactif (Davis, 2011).

Le signal olfactif est perçu par les neurones sensoriels qui projettent leurs axones (bleu) sur une paire de glomérules des lobes antennaires (AL). L'information est relayée par les neurones de projection (orange) à travers le tractus antenno-glomérulaire (ACT), et projettent au niveau de la corne latérale (LH) et des calices (C) contenant les dendrites des neurones des Mushroom Bodies (MBN, en jaune) dont les axones forment le pédoncule (p) et se séparent en lobes verticaux (α') et horizontaux (β' et γ).

Une carte olfactive stéréotypée est représentée par les connections entre les lobes antennaires, les neurones de projection et les interneurons (Gao et al., 2000; Vosshall et al., 2000). Une stéréotypie similaire peut être retrouvée au niveau des terminaisons entre les neurones de projection et la corne latérale. Au contraire, les zones de contact des neurones de projection sur les calices sont aléatoires, sans organisation fonctionnelle ou anatomique (Marin et al., 2002; Jefferis et al., 2007; Murthy et al., 2008; Caron et al., 2013). En effet, la corne latérale exerce une fonction de reconnaissance et d'évitement/attraction innée des odeurs, reposant sur une carte olfactive stéréotypée d'un individu à l'autre, alors qu'une représentation aléatoire et éparse des odeurs au niveau des MB permettrait une meilleure plasticité, favorisant leur fonction d'apprentissage olfactif.

b) Conservation moléculaire

Le génome de la drosophile est constitué de 4 paires de chromosomes : une paire de chromosomes sexuels (I ou X) et trois paires d'autosomes (II, III et IV). La 4^e paire de chromosomes étant la plus petite et ne contenant que peu d'information comparée aux autres, est peu utilisée en génétique puisqu'il n'y a pas ou peu d'insertions sur ce chromosome. Le génome de drosophile a été entièrement séquencé (Adams et al., 2000) et inclut environ 14 000 gènes codant des protéines. Pour comparaison, l'Homme en exprime environ 22 500.

De nombreux mécanismes moléculaires présentent un fort degré de conservation entre les espèces. Par exemple, plus de 60 % des gènes humains ont un orthologue fonctionnel chez la drosophile, principalement pour les processus développementaux et métaboliques. De plus, la drosophile est un bon modèle pour étudier en détail le fonctionnement des synapses et la communication synaptique : par exemple, les synapses de la jonction neuromusculaire de drosophile, qui sont glutamatergiques, sont utilisées pour modéliser les synapses neuronales glutamatergiques humaines. Enfin de nombreuses voies de signalisation, comme les voies Notch (Yamamoto et al., 2014), BDNF (Sutcliffe et al., 2013) ou NFκB (Leulier and Lemaitre, 2008), sont conservées entre la drosophile et l'Homme.

c) Des outils disponibles pour modéliser les maladies humaines

Il est particulièrement intéressant de remarquer que 70 % des gènes humains impliqués dans une pathologie ont un homologue chez la drosophile (Bernards and Hariharan, 2001; Reiter et al., 2001; Bier, 2005). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les processus moléculaires ayant cours lors du développement de ces maladies seraient conservés entre la drosophile et l'Homme. C'est ce fort degré d'homologie qui a permis à la drosophile de s'ériger comme l'un des animaux utilisés pour modéliser des maladies humaines et/ou mieux comprendre le rôle physiologique de gènes impliqués.

La drosophile a une durée de vie courte. Par conséquent chez cet organisme, l'étude des maladies liées au vieillissement est simplifiée et il est possible d'analyser leur développement.

Enfin, la drosophile permet d'exprimer des gènes humains afin de déterminer leur rôle physiologique ainsi que d'étudier leurs interactions et le développement de

processus pathologiques. Il est possible d'étudier l'impact d'une mutation ou d'une condition environnementale (température, humidité, etc.) d'un point de vue comportemental (défaut de mémoire, de vol, de reproduction...), physiologique (perturbation du métabolisme lipidique ou de voies de signalisation...), morphologique/développemental (défaut de formation d'un organe ou d'une structure, apparition de structures surnuméraires...) ou histologique (absence d'un type de cellule, maintien d'une forme non-mature de cellules...). A partir de ces connaissances, il est aussi possible d'identifier les voies moléculaires impliquées, et de développer des stratégies pour sauver les phénotypes observés (Figure 8).

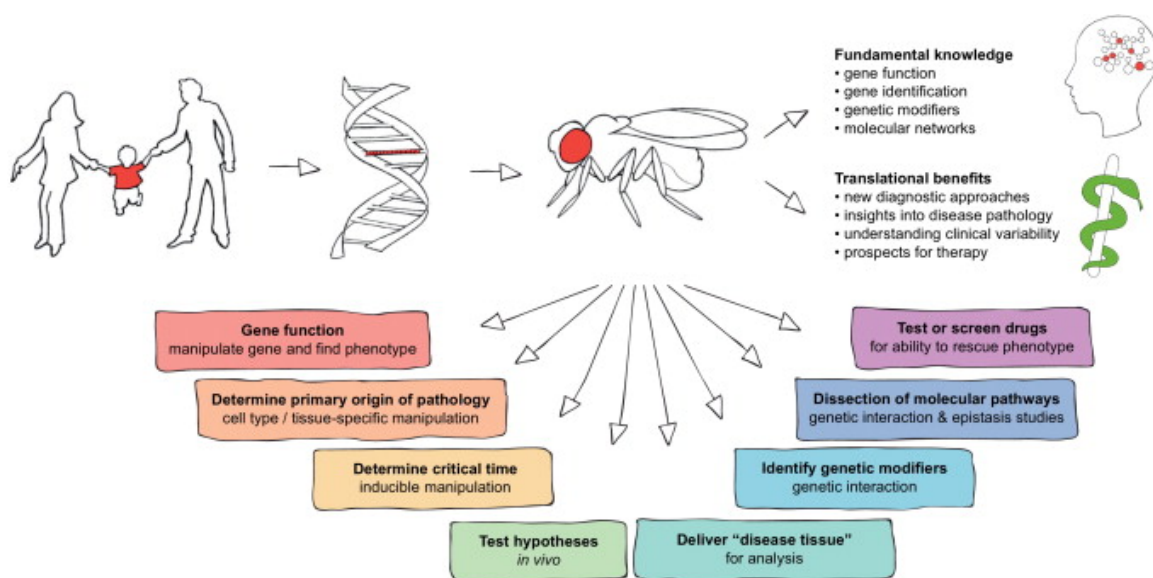


Figure 8 : La drosophile comme modèle pour l'étude des maladies humaines (van der Voet et al., 2014).

Les nombreuses approches disponibles pour étudier des défauts fonctionnels et morphologiques font de la drosophile un animal modèle parfaitement à même d'améliorer les connaissances fondamentales et de développer des approches translationnelles.

4) La drosophile présente 2 voies de mémoire olfactive parallèles et antagonistes

Au laboratoire, nous étudions la mémoire olfactive associative à l'aide de deux protocoles de type Pavlovien: un protocole appétitif et un protocole aversif. Le protocole appétitif permet d'associer une odeur à une présentation de sucre chez des drosophiles ayant au préalable été mises à jeuner. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le protocole

aversif qui consiste à présenter à des groupes de drosophiles une odeur (stimulus conditionné, CS+) couplée avec des chocs électriques (stimulus non conditionné, US), puis une deuxième odeur en l'absence de chocs électriques (CS-) (Figure 9A). Nous utilisons des odeurs aversives pour être certains que si les drosophiles se dirigent vers une odeur CS- , cela ne soit pas dû à une attirance par cette odeur, mais bien par une association entre l'odeur CS+ et les chocs électriques, ce qui doit augmenter l'aversion pour l'odeur CS+.

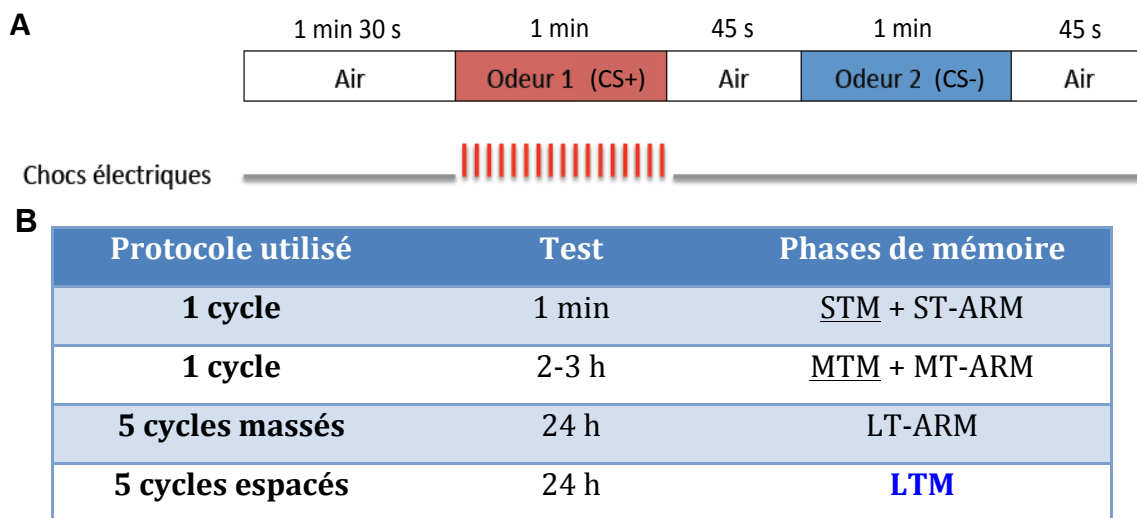


Figure 9 : Conditionnement olfactif aversif associatif et formes de mémoires associées.

A. Schéma d'un cycle de conditionnement olfactif aversif associatif : les chocs électriques sont couplés à la 1^{ère} odeur ou CS+ alors que la 2^e odeur ou CS- est présentée seule. B. Les différentes formes de mémoire formées en fonction du protocole utilisé : après un cycle de conditionnement, l'apprentissage composé de la Short Term Memory (STM) et de ST-Anesthesia Resistant Memory (ST-ARM) peut être observé une minute après conditionnement, alors que 2 h après conditionnement on peut distinguer la Middle Term Memory (MTM) et la MT-ARM. 24 h après 5 cycles espacés on peut observer la Long Term Memory (LTM) et 24 h après 5 cycles massés on peut observer la LT-ARM. Les formes de mémoire labiles sont soulignées et la phase de mémoire dépendante de la synthèse protéique *de novo* est indiquée en bleu.

Ce cycle de conditionnement peut être adapté en différents protocoles et la drosophile peut former différentes phases de mémoire en fonction du protocole utilisé (Figure 9B).

Après un cycle de conditionnement, il est possible d'observer une mémoire composée d'une composante dite labile, car pouvant être effacée par un choc anesthésiant, et d'une composante résistante à l'anesthésie par le froid (ARM). Pour distinguer ces 2 phases de

mémoire, les drosophiles sont soumises à un choc par le froid qui permet d'effacer la composante labile, ne laissant subsister que la ARM. Après un cycle de conditionnement, on peut donc différencier à 1 min la Short-Term Memory (STM) labile et la ST-ARM, et à 2 h la Middle-Term Memory (MTM) labile et la MT-ARM (Figure 9B).

Il existe aussi deux formes de mémoire dites consolidées, car observées 24 h après conditionnement, la LTM (Long-Term Memory) et la LT-ARM, qu'il est possible d'étudier distinctement grâce à deux protocoles différents : 5 cycles espacés par 15 min de repos permettent de former spécifiquement la LTM alors que 5 cycles massés permettent de former spécifiquement la LT-ARM (Figure 9B).

Il a pu être démontré que ces différentes formes de mémoire se présentent sous 2 voies parallèles et antagonistes, la formation de la LTM inhibant la formation de la LT-ARM et vice-versa (pour revue, McGuire et al., 2005; Isabel and Preat, 2008; Busto et al., 2010) (Figure 10).

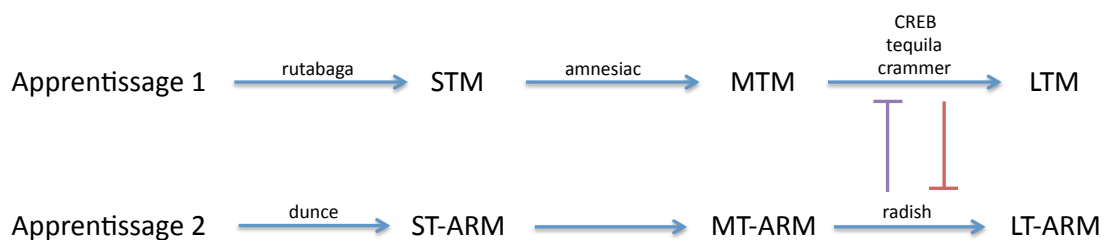


Figure 10 : Modèle des formes de mémoire parallèles (d'après McGuire et al., 2005).

La voie 1 dépend du gène rutabaga pour l'apprentissage initial, du gène amnesiac pour la formation de la MTM, et finalement des gènes CREB, tequila et crammer pour la consolidation de la MTM en LTM. La voie 2 dépend des gènes radish et dunce pour la formation de la ARM. La formation de la LTM inhibe celle de la LT-ARM et vice-versa.

La voie de mémoire 1 repose principalement sur le cAMP et le gène de mémoire historique rutabaga (*rut*) pour la STM, le gène amnesiac (*amn*) pour la MTM, ainsi que le facteur de transcription CREB pour la LTM (Figure 10) qui dépend de la synthèse protéique *de novo* (Tully et al., 1994).

La voie 2 est indépendante de la voie rutabaga. Elle repose sur les gènes historiques radish (*rsh*), codant une protéine dont la fonction exacte n'est pas encore connue mais possédant des séquences phosphorylables par la PKA, et la phosphodiesterase dunce (*dnc*) (Figure 10). Au départ, la ARM a été décrite comme une forme de mémoire à long-terme observée 24 h après 5 cycles massés. Il a ensuite été montré que la ARM est aussi

présente après un 1 cycle de conditionnement, mais ne peut être révélée qu'après effacement de la MTM. Il a enfin été montré que la mémoire à court-terme présentait aussi une composante ARM, la ST-ARM (Knapek et al., 2011).

Au cours de ma thèse, je me suis concentrée sur l'étude de gènes qui se sont révélés être requis dans la formation de la voie de mémoire 1. La fonction des gènes spécifiquement impliqués dans la voie cAMP et la voie de mémoire 1 sera détaillée dans la partie I. 6.

5) Les circuits neuronaux impliqués dans la voie labile de mémoire

La structure du circuit neuronal permettant de former la voie 1 de mémoire n'est pas encore entièrement appréhendée. Au fur et à mesure des recherches, l'implication de certains neurones ou structures a pu être démontrée mais l'image que nous avons de ce circuit est encore incomplète. Je vais présenter ici, de façon non exhaustive, certaines structures formant un circuit nécessaire pour la formation de cette voie de mémoire : les Mushroom Body, les neurones Dorsal Paired Medial et les neurones Anterior Paired Lateral.

a) Les Corps Pédonculés (Mushroom Body, MB), centre de la mémoire olfactive

Les MB sont une structure bilatérale composée de 4 000 neurones, les cellules de Kenyon, dont les axones projettent en un pédoncule puis se séparent pour former 5 lobes. Les neurones α/β et α'/β' projettent leurs axones qui se divisent en 2 branches chaque : deux verticales formant les lobes α et α' et deux horizontales formant les lobes β et β' . Les axones des neurones γ ne bifurquent pas et forment une branche unique horizontale (lobe γ) (Figure 11).

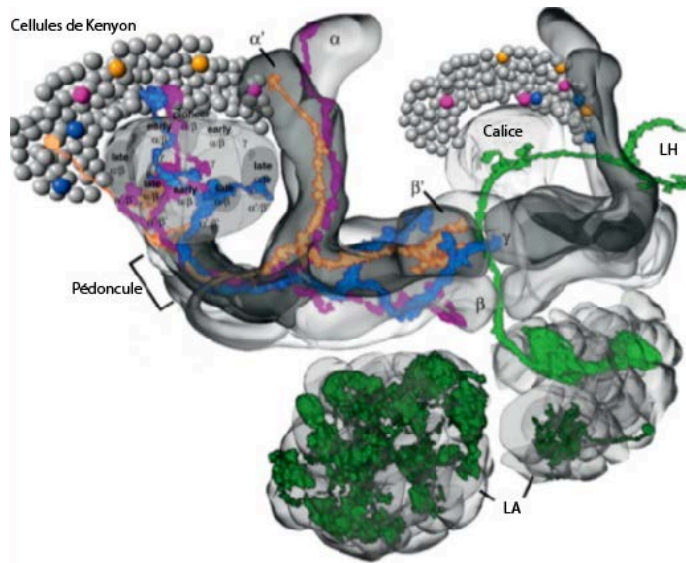


Figure 11 : Représentation schématique des Mushroom Body et de leurs afférences olfactives (Dubnau and Chiang, 2013).

Les neurones sensoriels olfactifs projettent sur les lobes antennaires (LA) d'où les neurones de projection, en vert, projettent via les tractus antenno-cérébraux et connectent les dendrites des MB localisés dans les calices, et également la corne latérale (Lateral Horn, LH). Chaque MB est composé d'environ 2 000 neurones appelés cellules de Kenyon, répartis en trois types (α/β en magenta, α'/β' en orange et γ en bleu) qui projettent dans 5 lobes.

Les MB sont considérés comme le centre de la mémoire olfactive de la drosophile : en effet, cette structure est nécessaire pour la formation de la mémoire (de Belle and Heisenberg, 1994) et chaque type cellulaire est spécifiquement impliqué dans des phases de mémoire particulières (Bouzaiane et al., 2015). Les neurones γ sont impliqués dans la STM et la MT-ARM. Les neurones α et β sont impliqués dans la ST-ARM, la MTM et dans la LTM. Les neurones α' et β' sont impliqués dans la LT-ARM.

Le ou les neurotransmetteur(s) des MB ont été longtemps une énigme pour le domaine. En 2016, il a été montré que certaines synapses nécessaires à la formation de la mémoire olfactive étaient cholinergiques (Barnstedt et al., 2016). L'existence d'autres neurotransmetteurs exprimés par les MB n'est pas encore confirmée.

b) Les neurones Dorsal Paired Medial

Les neurones Dorsal Paired Medial (DPM) sont une paire de neurones projetant sur les lobes des MB : le corps cellulaire envoie un neurite en direction antérieure et dorsale. Ce neurite fait une boucle et se sépare, une branche allant vers la partie médiale des lobes

horizontaux alors que l'autre branche se sépare à nouveau en direction de la partie dorsale et de la partie ventrale des lobes verticaux (Figure 12).

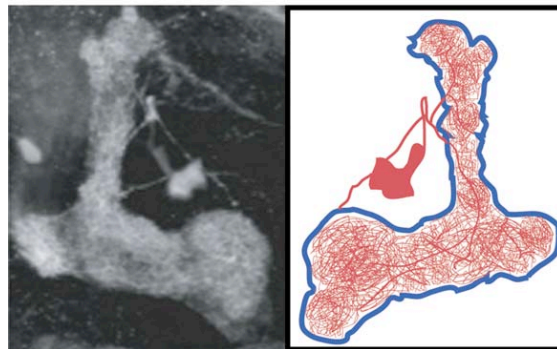


Figure 12 : Image de projection (à gauche) et schéma représentatif (à droite en rouge) du soma et des projections d'un neurone DPM sur les MB (dont le contours est indiqué en bleu) (Yu et al., 2005).

Les neurones DPM ont été impliqués dans la MTM et la LTM (Waddell et al., 2000; Yu et al., 2006; Lee et al., 2011) ainsi que dans la MT-ARM (Lee et al., 2011).

Ces deux fonctions peuvent s'expliquer par la différence des produits sécrétés : le neuropeptide amnesiac (amn, voir I.6.c), impliqué dans les formes de mémoires labiles et agissant sur les neurones α/β , et la sérotonine (5HT), impliquée dans la ARM et agissant sur les neurones α'/β' . En effet, les neurites des DPM entourent tous les lobes des MB et sont particulièrement présents au niveau des lobes α'/β' . De plus, il est possible qu'il y ait des répartitions différentes des récepteurs à la 5HT au niveau de la membrane des lobes, ainsi que du récepteur d'AMN.

De façon intéressante, il a été proposé que les DPM et les MB forment une boucle de rétroaction positive permettant de maintenir le niveau d'activité intraneuronale nécessaire à la MTM. Les MB activeraient les neurones DPM qui en retour prolongeraient l'activation des MB via la sécrétion d'AMN (Keene et al., 2004; Pitman et al., 2011).

Plus récemment, Haynes et collègues (2015) ont étonnamment observé que les neurones DPM seraient inhibiteurs et non excitateurs : ils sécrèteraient de la 5HT (rôle inhibiteur via ses récepteurs 5HT-2AR) et du GABA. Ainsi l'activation des DPM aurait un rôle inhibiteur sur les neurones α'/β' .

c) Lien entre les neurones Anterior Paired Lateral et DPM : une interaction permettant la formation de la mémoire labile

Les neurones Anterior Paired Lateral (APL) sont impliqués dans la MT-ARM (Wu et al., 2013) en sécrétant de l'octopamine vers les neurones α'/β' . Cette implication est additive à l'effet de la 5HT produite par les neurones DPM sur ces mêmes neurones des MB.

Il est particulièrement intéressant de voir qu'une communication cellulaire a été décrite entre les neurones APL et DPM par Wu et collègues (2011, Figure 13) : les neurites de ces neurones communiquent au niveau des neurones α'/β' via des jonctions gap permettant ainsi la formation de la MTM.

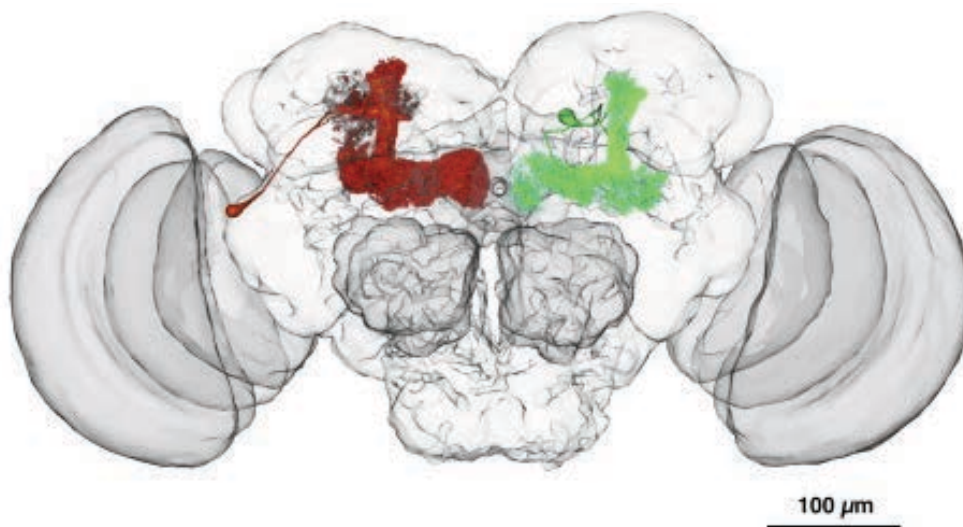


Figure 13 : Modélisation 3D des neurones APL et DPM au sein du cerveau de drosophile (Pitman et al., 2011).

La localisation des corps cellulaires et des projections neuronales au niveau des MB est montrée pour les neurones DPM (en vert) et APL (en rouge). Par souci de clarté, un seul neurone de chaque type a été représenté par hémisphère.

Ces rôles contradictoires des neurones APL pourraient s'expliquer par l'hypothèse d'une boucle de rétroaction entre les neurones DPM et les MB concernant la formation de la MTM. En effet, si cette hypothèse est juste, le risque est qu'il n'y aurait aucun frein permettant de limiter l'excitotoxicité du système. Les communications entre les neurones DPM et APL pourraient empêcher cette hyperactivité. Les APL étant

inhibiteurs, via la sécrétion de GABA, leur action pourrait diminuer l'excitation des DPM et la libération du neuropeptide, empêchant ainsi une excitotoxicité du système.

Si les neurones DPM sont bien inhibiteurs et non pas excitateurs (Haynes et al., 2015), il est aussi possible que ces deux paires de neurones puissent inhiber les neurones α'/β' , et donc inhiber la formation de la LT-ARM, ce qui favoriserait la formation des formes de mémoire de la voie 1 de mémoire.

6) Gènes impliqués dans la voie de signalisation cAMP et dans la voie de mémoire 1

a) Importance et rôle de la voie de signalisation cAMP

La voie de mémoire 1 (composée de la STM, MTM et LTM) repose sur la voie de signalisation du cAMP. En effet, la majorité des gènes dont les mutations provoquent un défaut de mémoire labile sont impliqués dans la voie cAMP (Waddell and Quinn, 2001; Isabel and Preat, 2008) : cette voie débute par l'activation de l'Adenylate Cyclase rut qui augmente la production de cAMP intracellulaire lors de la détection de coïncidence des inputs olfactifs et sensitifs, dont la quantité est régulée par dnc. Cette augmentation de cAMP permet l'activation de la PKA DC0 qui est responsable de la formation de la MTM, et de l'activation d'acteurs, dont le facteur de transcription CREB qui est requis pour la formation de la LTM (Figure 14). Enfin, le rôle hypothétique d'AMN, dont les caractéristiques sont détaillées dans la section I.6.c, serait d'aider à activer rut.

D'autres gènes sont aussi impliqués dans la formation des mémoires de la voie 1 mais ne semblent pas requis directement dans la voie cAMP. C'est le cas des gènes tequila (Didelot et al., 2006) et crammer (Comas et al., 2004), spécifiques de la LTM, ou linotte (Dura et al., 1993) et latheo (Boynton and Tully, 1992), requis spécifiquement pour la formation de la STM.

métabotropiques (activés par les neurones dopaminergiques, représentant l'US, soit les chocs électriques) (Figure 15).

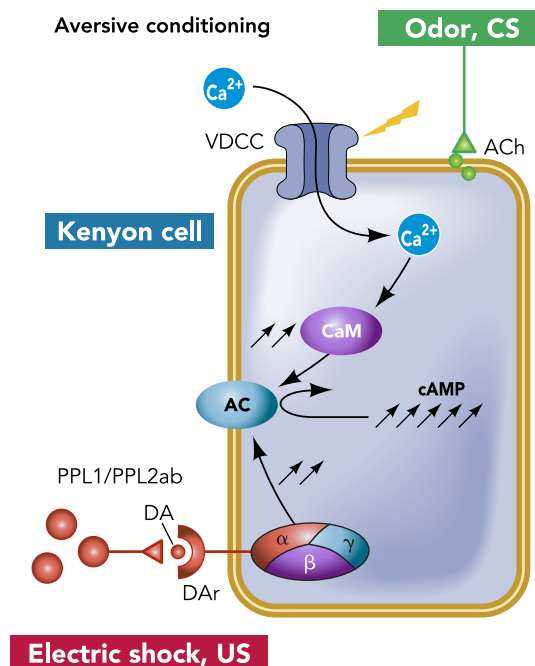


Figure 15 : La détection de coïncidence lors de la formation de la mémoire olfactive aversive (Busto et al., 2010).

L'odeur est codée par des neurones cholinergiques (ACh) qui activent des canaux calciques et les chocs sont codés via les neurones dopaminergiques (DA) qui activent leurs récepteurs des MB. Ces deux voies permettent d'activer une Adénylate Cyclase. Lorsque les chocs et l'odeur sont appariés, une Adénylate Cyclase est activée de façon synergique, ce qui permet de former la mémoire.

Les possibles modulations de la détection de coïncidence par divers stimulus, notamment par la sécrétion du neuropeptide AMN, ne sont pas encore démontrées.

c) Le neuropeptide amnesiac

Le gène amnesiac est l'un des premiers gènes de mémoire découverts chez la drosophile. En 1979, Quinn et collègues (1979) publient la découverte d'un nouveau mutant de mémoire, nommé amnesiac, apprenant normalement mais oubliant 4 fois plus vite que les drosophiles contrôles.

Le gène amnesiac code un préproneuropeptide qui contiendrait 3 peptides : le premier est homologue de la Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH), le deuxième

de la Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Peptide (PACAP), et le 3^e ne présente pas d'homologie avec des protéines connues (Figure 16).

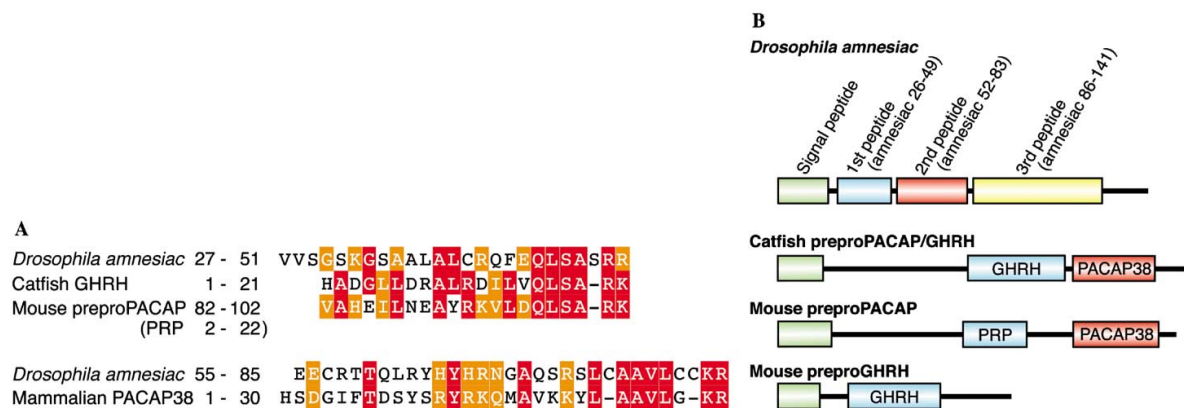


Figure 16 : Structure du gène amnesiac (Hashimoto et al., 2002).

A. Alignement des séquences d'acide-aminés des peptides prédictifs du gène amnesiac, du peptide PACAP-like PRP de la souris, du GHRH du poisson-chat et du PACAP38 de mammifère. Les acide-aminés identiques sont indiqués en rouge, et les acides-aminés similaires en orange. B. Représentation schématique des préproneuropeptides prédictifs encodés par amnesiac, preproPACAP/GHRH du poisson-chat, preproPACAP et preproGHRH de souris. C. Schéma hypothétique de l'évolution des gènes PACAP, VIP et GHRH.

Ces homologies suggèrent que le gène amnesiac pourrait être impliqué aussi bien dans le développement que dans la mémoire. En effet, chez les Mammifères la GHRH est impliquée dans le développement et PACAP est impliqué dans la mémoire via la voie cAMP qui permettrait l'activation d'une AC (Spengler et al., 1993). Il a donc été proposé chez la drosophile qu'amnesiac pourrait activer l'AC rut et permettre ainsi la détection de coïncidence lorsque l'action d'AMN est intégrée conjointement aux signaux olfactifs (codés par l'ACh) et sensitifs (codés par la DA) (Kandel and Abel, 1995) (Figures 14 et 17).

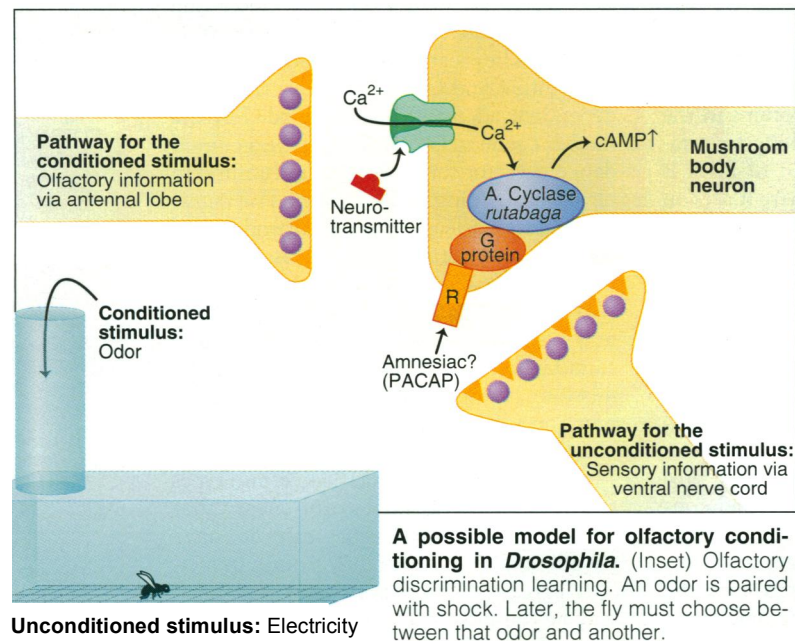


Figure 17 : Représentation d'un modèle des mécanismes du conditionnement olfactif chez la drosophile (Kandel and Abel, 1995).

Les odeurs (CS) sont codées par les voies olfactives qui activent les récepteurs liés au Ca^{2+} , ce qui permet d'activer l'AC rut. Les chocs (US) seraient codés par la corde nerveuse centrale et ce signal serait transmis aux MB via l'activation d'un récepteur couplé à une petite protéine G permettant, conjointement à l'action d'amnesiac, l'activation de rut. Lors de l'appariement des signaux représentant l'odeur et les chocs, ainsi que le signal porté par amnesiac, rut est activée fortement de façon synergique.

Le neuropeptide amnesiac est requis pour la MTM (Waddell et al., 2000) et pour la LTM (Yu et al., 2006). En effet, la trace mnésique spécifique de la LTM présente dans les neurones α disparaît dans un contexte mutant pour amnesiac (Yu et al., 2006). En revanche, amnesiac étant constitué de trois peptides hypothétiques, la fonction de chacun d'eux dans la mémoire et le développement n'est pas encore connue.

Le gène amnesiac est exprimé dans deux neurones, les neurones DPM, et non pas dans les MB (Waddell et al., 2000) : l'utilisation d'anticorps dirigés contre AMN marque les corps cellulaires des neurones DPM et un sauvetage du défaut de MTM d'un mutant amn est observé en surexprimant amnesiac dans les neurones DPM. En revanche, l'expression d'amnesiac sous le contrôle de deux drivers des MB, c747 et c309, ne permet pas de sauver le défaut de MTM du mutant nul amn^{x8} (Waddell et al., 2000).

En 1999, DeZazzo et collègues proposent l'hypothèse que le déficit de mémoire du mutant amnesiac est développemental et non pas dû à un effet chez l'adulte (DeZazzo et al., 1999). En effet, ils montrent qu'il est possible de sauver un mutant nul amn en

exprimant le gène sauvage amnesiac au cours du développement, mais pas avec une expression conditionnelle chez l'adulte. Pourtant, il a été publié que la morphologie des neurones DPM semblait normale chez un mutant nul (Keene et al., 2004).

Au cours du vieillissement, les drosophiles présentent une perte spécifique de mémoire, l'Age-Related Memory Impairment (AMI). amnesiac est requis pour la forme de mémoire affectée : les caractéristiques de l'AMI sont similaires à celles des défauts de mémoire observés chez les mutants amnesiac (Tamura et al., 2003). De plus, les mutants amnesiac ne présentent pas d'AMI, indiquant ainsi que la mémoire affectée lors du vieillissement n'est pas présente chez les mutants amnesiac. Enfin, la surexpression du gène amnesiac sous le contrôle d'un pilote d'expression dans les neurones DPM permet de restaurer l'AMI chez des mutants du gène amnesiac. Il a aussi été montré que la trace mnésique observée dans les neurones DPM lors de la formation de la MTM se perd avec l'âge, et que l'activation des neurones DPM chez des drosophiles âgées permet de restaurer la mémoire affectée lors de l'AMI, en permettant une augmentation de la sécrétion d'amnesiac (Tonoki and Davis, 2012).

d) La phosphodiesterase dunce (dnc)

Le gène dunce code une phosphodiesterase (Qiu and Davis, 1993) principalement exprimée dans les MB (Nighorn et al., 1991; Qiu and Davis, 1993). dnc permet de diminuer la quantité de cAMP en modulant l'activité de l'AC rut.

Les drosophiles homozygotes pour la mutation de ce gène présentent des défauts de mémoire aversive (Dudai et al., 1976) et appétitive, ainsi qu'une infertilité des femelles (Qiu and Davis, 1993). Il a été montré que l'expression de dnc chez des mutants nuls entre 30 min et 1 h avant le conditionnement permet de sauver le défaut de mémoire (Dauwalder and Davis, 1995). Il a pu être démontré par la suite que dnc est impliqué dans la formation de la composante ARM de la mémoire : le mutant dnc¹ présente un défaut de ST-ARM, MT-ARM et LT-ARM (Scheunemann et al., 2012).

Le rôle de dnc dans la mémoire serait de réguler et de localiser l'action du cAMP et de la PKA spécifiquement dans le lobe α : dnc n'a de rôle sur la PKA que pour la mémoire aversive en réponse à la dopamine. dnc et rut interagissent avec la PKA par l'intermédiaire des protéines d'échafaudage A Kinase-Anchoring Proteins (AKAP, Gervasi et al., 2010). L'action de dnc pourrait aussi moduler la MTM en inhibant sa

formation qui nécessite une augmentation de cAMP pour favoriser la formation de la ARM.

e) la PKA : le principal effecteur de l'activité de rutabaga

La PKA est membre de la famille des kinases sérine/thréonine. Elle est l'une des principales cibles de l'AC et est généralement composée de 2 sous-unités catalytiques, inactives lorsqu'elles sont associées à 2 sous-unités régulatrices. Après liaison au cAMP, les sous-unités catalytiques se dissocient des sous-unités régulatrices, ce qui permet leur activation sous forme de monomères (Figure 18). Chez la drosophile, seul un gène codant une sous-unité régulatrice R1 est présent. Concernant les sous-unités catalytiques, 3 gènes sont présents : DC0, DC1 et DC2. La sous-unité DC0 est la plus étudiée car elle est présente chez l'adulte et dans la majorité des tissus (revue, Davis et al., 1995).

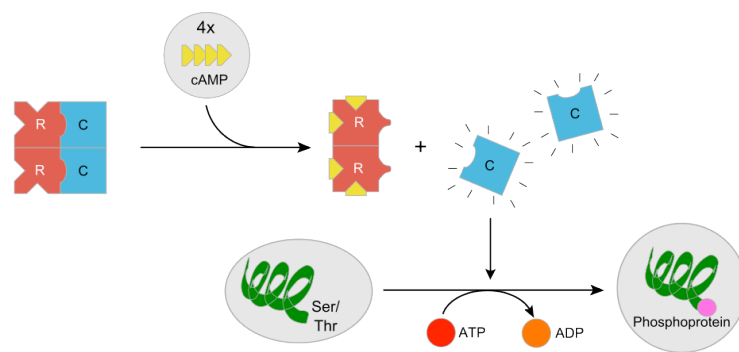


Figure 18 : Schéma d'action de la PKA.

Le cAMP se fixe sur les sous-unités régulatrices de la PKA (en rouge), ce qui permet leur libération et la levée de l'inhibition de l'activité des sous-unités monomériques catalytiques (bleues). Celles-ci peuvent alors phosphoryler leurs cibles au niveau d'une Sérine ou d'une Thréonine. Lorsque la concentration de cAMP diminue, les sous-unités régulatrices se lient à nouveau aux sous-unités catalytiques et inhibent leur activité.

DC0 est principalement exprimée dans les MB (Skoulakis et al., 1993). Il a été montré qu'elle pouvait phosphoryler des canaux potassiques dépendants du calcium et augmenter la probabilité d'exocytose des neurotransmetteurs à la synapse (revue, McGuire et al., 2005).

f) Les gènes impliqués dans la formation de la LTM : creb, crammer, tequila

Le gène impliqué dans la formation de la LTM le plus connu est CREB. Il est la cible de la PKA et son action est une des dernières étapes de la voie du cAMP impliquée dans la formation de la mémoire de la voie 1. Il s'agit d'un facteur de transcription activant l'expression de divers gènes permettant la synthèse de protéines nécessaires à la plasticité synaptique. La drosophile exprime deux gènes : dCREB2-a, qui encode la protéine homologue au CREB humain, et dCREB2-b, qui fonctionne comme un CREB dominant négatif car il n'est pas phosphorylable par la PKA. Après phosphorylation par la PKA DC0, dCREB2-a peut se fixer sur les séquences régulatrices CRE (CREB Response Element) et activer la transcription de gènes de plasticité et de mémoire. Une surexpression de dCREB2-a permet la formation de LTM après un cycle de conditionnement aversif (Yin et al., 1995), ce qui laisse à penser que dCREB serait un composant limitant de la formation de la LTM.

Le gène *crammer* code une protéine agissant comme un inhibiteur des cathepsines. Bien qu'exprimé dans les MB, son rôle dans la LTM se déroule dans les cellules gliales : la LTM est affectée si *crammer* est surexprimé dans la glie, et les drosophiles sauvages présentent une diminution du mRNA *crammer* 3 h après 5 cycles espacés de conditionnement aversif (Comas et al., 2004). A partir de ces résultats, deux hypothèses sont apparues : soit *crammer* est sécrété par les cellules gliales pour agir sur les MB, soit il n'a une action que sur les cellules gliales qui répriment la formation de la LTM (Isabel and Preat, 2008).

Enfin le gène *tequila* est considéré comme spécifique de la LTM. C'est un homologue de la neurotrypsin, dont les mutations sont associées chez l'homme à des retards mentaux. *tequila* code une sérine-protéase exprimée dans les MB adultes. Son expression augmente plus de 30 fois 4 h après 5 cycles espacés de conditionnement aversif, surtout dans le pédoncule des MB (Didelot et al., 2006) mais son rôle exact dans la formation de la LTM est encore inconnu.

La transcription des gènes *crammer* et *tequila* est strictement régulée après un conditionnement espacé. On peut donc supposer que ces gènes puissent être des cibles de CREB. En conclusion, l'ensemble de ces données indique l'importance des mécanismes de régulation de la transcription pour la plasticité requise pour la formation de la LTM.

II. Les traces mnésiques

1) Qu'est-ce qu'une trace mnésique ?

a) Définition

Certains neurones présentent une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium en réponse à un stimulus non conditionné. Dans le cadre du conditionnement olfactif, ce stimulus est une odeur. Une trace mnésique est une modification de cette réponse, après conditionnement réalisé avec l'une de ces odeurs : cette modification peut être une augmentation ou une diminution de la réponse calcique. Il est supposé que les neurones pouvant présenter une trace mnésique répondent aussi bien aux odeurs qu'aux chocs électriques.

b) Des outils d'imagerie disponibles

Pour étudier les traces mnésiques, les sondes calciques GCaMP sont le plus souvent utilisées. En développant ces sondes, la famille GCaMP s'est diversifiée pour couvrir les besoins en imagerie : certaines ont une sensibilité très forte, d'autres présentent très peu de bruit de fond, d'autres sont plus intenses (Wachowiak and Knöpfel, 2009)...

c) Conditionnement utilisé

Etant donné que les neurones étudiés répondent aux odeurs et aux chocs, pour distinguer la réponse spécifique après conditionnement de la réponse simple à l'odeur, on compare deux types de conditionnement : un conditionnement dit apparié (l'odeur est délivrée en même temps que les chocs) et un conditionnement dit non-apparié (l'odeur est délivrée après les chocs). Cela permet de différencier l'effet dû aux modifications causées par les chocs de celles qui constituent la trace mnésique.

2) Les traces spécifiques de la LTM

a) Dans le lobe α

Yu et collègues ont montré en 2006 que les neurones α présentaient une trace mnésique 9 à 24 h après un conditionnement espacé (Yu et al., 2006). Cette trace est spécifique d'un conditionnement 5x espacé, dans les neurones α .

Il est aussi à noter que cette trace dépend du gène amnesiac : les mutants amn présentent un défaut de LTM et ne forment de trace mnésique ni à 9 h, ni à 24h.

b) Dans le lobe γ : un résultat controversé

Akalal et collègues (2010) ont présenté un rôle des neurones γ dans la LTM, ainsi que la présence d'une trace mnésique 18 à 48 h après un conditionnement 5x espacé dans ces neurones. Ce résultat est controversé car l'implication des neurones γ dans la formation de la LTM a été réfutée par plusieurs articles (Isabel et al., 2004; Bouzaiane et al., 2015).

3) Les traces spécifiques de la MTM

a) Dans les neurones DPM

La première trace décrite associée à la formation de la MTM a été observée dans les neurones DPM entre 30 min et 1 h après conditionnement (Yu et al., 2005). Cette trace dépendrait de la fonction du gène amnesiac puisque les mutants amn ne présentent pas cette trace 30 min après conditionnement, alors qu'elle réapparaît si le gène amnesiac est réexprimé grâce au driver c316.

b) Dans les neurones MB-V2

Séjourné et collègues en 2011 ont observé une trace mnésique dans les neurones MB-V2 3 h après conditionnement (Séjourné et al., 2011). Ces neurones sont efférents aux MB et sont cholinergiques. Cette trace est différente de celles observées dans d'autres neurones : elle ne se présente pas sous la forme d'une augmentation de la réponse à l'odeur utilisée lors du conditionnement, mais sous la forme d'une diminution de la réponse à l'odeur. Il s'agit de la seule trace mnésique « inhibitrice » observée jusqu'à présent.

c) Étonnamment aucune trace mnésique associée à la formation de la MTM n'a encore été décrite dans les MB

Pour l'instant, aucune trace mnésique n'a été observée dans les MB pour la MTM. Étant donné que les neurones α/β sont impliqués dans cette phase de mémoire, il serait intéressant de rechercher la présence d'une trace dans ces neurones. Il est possible que

cette recherche ait été tentée, mais à un temps ne permettant pas son observation, ou que les sondes utilisées n'aient pas eu les caractéristiques nécessaires pour observer cette modification de la réponse à l'odeur.

4) Une trace mnésique de la STM observée dans les neurones de projection des voies olfactives (dans les lobes antennaires)

La seule trace de STM décrite à ce jour apparaît dans les lobes antennaires entre 3 et 10 min après conditionnement (Yu et al., 2004). Avant conditionnement, seuls certains neurones de projection répondent à une odeur précise selon un pattern stéréotypé. Après conditionnement, la présentation de cette odeur active un plus grand nombre de neurones. De nouveaux neurones de projection sont recrutés à ce niveau pour répondre au CS+. Cette observation a permis de proposer l'hypothèse que l'intégration de l'odeur et des chocs se ferait en premier lieu dans les lobes antennaires.

III. Rôles de l'Amyloid Precursor Protein (APP) et des peptides amyloïdes

1) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est un trouble neurodégénératif décrite par Aloïs Alzheimer en 1906 (observations parues en 1995 dans l'article de Stelzmann et al. (1995) traduit de « Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde » de 1906). La première manifestation clinique est la perte des souvenirs récents, et elle évolue vers une altération de toutes les capacités mnésiques et la détérioration progressive de la condition cognitive menant ultimement au décès. L'âge étant le premier facteur de risque de la maladie, et compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie, la recherche de traitements apparaît comme un enjeu de société majeur (pour revue, Bekris et al., 2010).

Histologiquement, deux types de lésions caractéristiques sont observables chez les patients : des dégénérescences neurofibrillaires dues à des inclusions filamenteuses constituées de protéines Tau hyperphosphorylées dans le cytoplasme de neurones, et la présence de plaques dites amyloïdes composées d'agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes- β (A β) (pour revue, Querfurth and LaFerla, 2010).

Il existe deux formes de la maladie : une forme sporadique, très majoritaire, qui se manifeste essentiellement après 60 ans, et une forme héréditaire, apparaissant plus précocement. Les formes sporadiques présentent une composante génétique, souvent un allèle apportant une susceptibilité à la maladie (l'allèle Apolipoprotéine E4, ou ApoE4, présent dans 10 à 20 % de la population par exemple), ainsi qu'une composante environnementale, comme l'exposition à l'aluminium, le diabète, les maladies cardiovasculaires... Il est intéressant de noter que certains facteurs environnementaux, comme la consommation régulière d'antioxydants, l'activité physique et les interactions sociales régulières, permettent de réduire l'incidence de la maladie (pour revue, Stozická et al., 2007).

Les formes héréditaires sont très rares (moins de 0,1 % des cas) et sont dues à une mutation autosomique dominante présente sur le gène codant l'Amyloid Precursor Protein (APP), ou les gènes codant les présénilines 1 et 2 (pour revue, Bekris et al., 2010). Leur symptomatologie est similaire à celle des formes sporadiques, mais plus

agressive. L'étude des formes héréditaires sert de base pour la compréhension des mécanismes moléculaires et des dysfonctionnements neuronaux responsables de la maladie.

2) APP, un acteur majeur de la maladie d'Alzheimer

Les mutations du gène APP sont impliquées dans 15 à 20 % des cas héréditaires de la maladie d'Alzheimer. Sachant qu'APP est présent sur le chromosome 21, il est intéressant de noter que les personnes souffrant du syndrome de Down, ou trisomie 21, développent précocement une démence de type maladie d'Alzheimer. La majorité des autres mutations impliquées dans cette maladie concerne les gènes de présénilines 1 et 2 qui font partie du complexe protéique de la γ -sécrétase. Ces mutations provoquent une augmentation de la protéolyse d'APP, ce qui conduit à une augmentation de la production de différents produits pouvant avoir des rôles toxiques, comme les peptides A β , principaux composants des plaques amyloïdes.

Par conséquent, la protéine APP a été placée comme acteur central et majeur de la maladie d'Alzheimer.

a) APP chez les mammifères

Les mammifères possèdent 2 homologues du gène APP : APP-Like Protein (APLP) 1 et 2. Les gènes APP, APLP1 et APLP2 présentent des fonctions redondantes, et le knock-out des 3 gènes chez la souris est létal (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004), compliquant ainsi l'étude exacte des fonctions d'APP. Ce gène a été fortement conservé au cours de l'évolution. Il est principalement connu pour être le précurseur des peptides A β .

APP est une protéine membranaire de type I avec un seul domaine transmembranaire, une large région ectoplasmique N-terminale et une région C-terminale cytoplasmique plus courte. La région ectoplasmique est composée de 2 grands domaines, E1 et E2, séparés par un domaine inhibiteur de protéase Kunit (KPI) : E1 contient des domaines de liaison à l'héparine de type facteur de croissance (HBD/GFLD), ainsi que des domaines de liaison à des métaux comme le cuivre et le zinc, alors que E2 ne présente qu'un domaine HBD/GFLD. La partie cytoplasmique contient un motif d'interaction protéique YENPTY, qui semble impliqué dans de nombreuses fonctions

d'APP et qui pourrait permettre son internalisation (Figure 19, Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

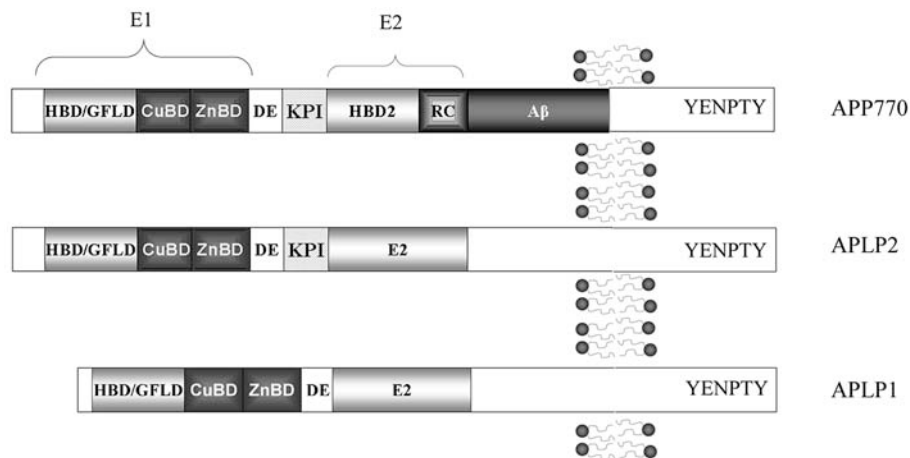


Figure 19 : Illustration schématique de l'organisation des domaines de la famille d'APP (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

Tous les membres de la famille d'APP contiennent un domaine de liaison à l'héparine/de type facteur de croissance (HBD/GFLD), des domaines de liaison au cuivre et au zinc (CuBD et ZnBD), un domaine acide (DE) et un motif d'interaction protéique (YENPTY) en C-terminal.

APP est principalement présente dans les neurones mais aussi dans d'autres tissus. Il existe 3 isoformes majeures d'APP : APP695, 751 et 770 (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). APP peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles en fonction de différents stimuli, comme le stress cellulaire, dont la présence permet de moduler le clivage d'APP par l'une ou l'autre des sécrétases (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

b) Maturation de la protéine APP

La protéine APP peut être clivée selon deux voies de maturation : la voie amyloïdogénique, principalement connue pour produire des peptides Aβ, et la voie non amyloïdogénique, provoquant la libération de la partie sécrétée sAPPα dont de nombreuses publications pointent le rôle neuroprotecteur (Müller and Zheng, 2012). Lors de ces deux voies, des clivages séquentiels d'APP ont lieu permettant de libérer différents produits. Ces clivages sont réalisés par des sécrétases : d'abord par l'α-sécrétase, appartenant à la famille des métalloprotéinases ADAM, ou la β-sécrétase,

BACE, puis, dans un second temps, par la γ -sécrétase, complexe protéique composé entre autres des présénilines 1 et 2 (PS1 et 2).

Dans la voie non amyloïdogénique, APP est d'abord clivée par l' α -sécrétase pour libérer le sAPP α extracellulaire et un fragment α -CTF membranaire qui va être ensuite clivé par la γ -sécrétase pour générer un fragment p3 extracellulaire et un fragment intracellulaire (APP IntraCellular Domain, AICD). Lors de la voie amyloïdogénique, APP est clivée par la β -sécrétase pour former un fragment extracellulaire sAPP β , et un fragment membranaire β -CTF qui est clivé ensuite par la γ -sécrétase pour produire un fragment extracellulaire A β et un AICD (Figure 20).

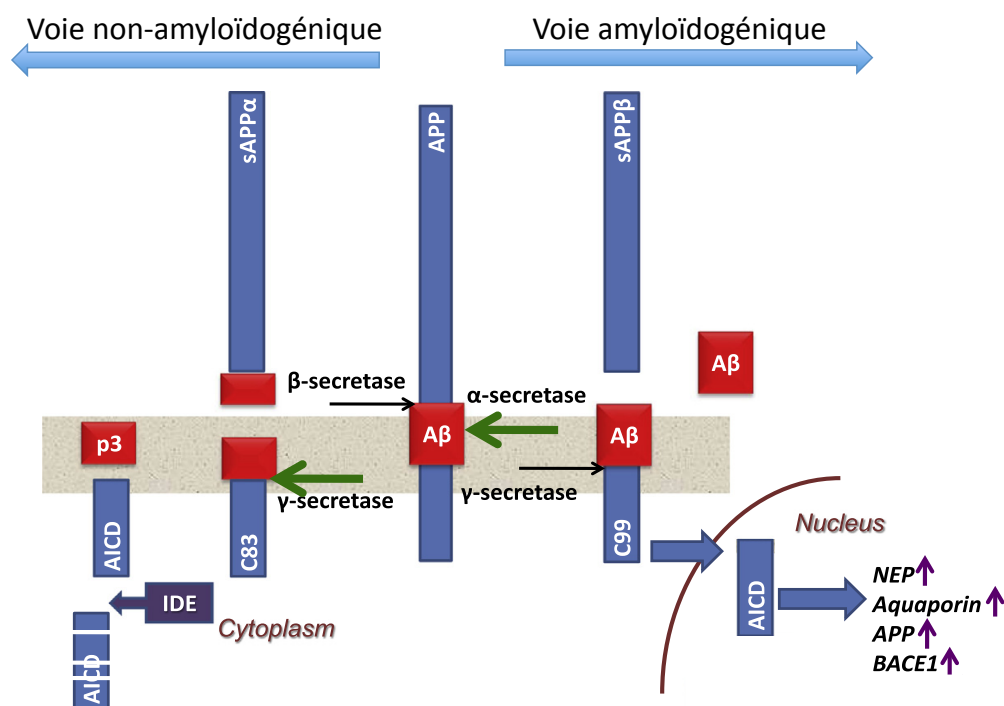


Figure 20 : Les clivages séquentiels d'APP se produisent suivant 2 voies (adapté de Nalivaeva and Turner, 2013).

La voie non amyloïdogénique d'APP est initiée par un clivage par l' α -sécrétase, suivi d'un clivage par la γ -sécrétase. La voie amyloïdogénique est initiée par l'activité de la β -sécrétase BACE1, suivie par celle de la γ -sécrétase. Ces deux voies génèrent des ectodomains solubles (sAPP α et sAPP β) et un fragment intracellulaire identique AICD. L'AICD produit par la voie non amyloïdogénique est dégradé par une peptidase, l'IDE, dès sa libération dans le cytoplasme, alors que l'AICD produit par la voie amyloïdogénique est importé dans le noyau où il jouerait un rôle pour l'activation de la transcription de différents gènes. Seule la voie amyloïdogénique permet de produire des peptides A β .

Les deux voies de protéolyse permettent donc la libération du fragment AICD. Néanmoins, l'AICD produit par la voie non amyloïde, et celui produit par la voie amyloïde, auraient des destins différents : le premier serait dégradé peu de temps après sa libération au niveau de la membrane cellulaire où se produit la coupure par l' α -sécrétase (Figure 21), alors que le deuxième, libéré des endosomes où se produit la coupure par la β -sécrétase (Figure 21), se lierait à diverses protéines avant d'être transporté dans le noyau (Figure 20). L'AICD jouerait un rôle dans la transcription de nombreux gènes, dont APP lui-même, et d'autres codant des enzymes de dégradation des peptides A β , ainsi que des protéines impliquées dans différents mécanismes (GSK3 β , EFGR, p53...). Le statut de phosphorylation d'APP au niveau du motif YENPTY d'internalisation nucléaire contenu dans la séquence d'AICD modulerait l'interaction d'AICD avec des adaptateurs nucléaires (Zheng and Koo, 2011).

Les rôles d'autres métabolites issus de la maturation d'APP ont pu être décrits : par exemple, sAPP β peut se lier à un récepteur et activer la transcription de gènes comme transthyréthine (TTR), codant une protéine séquestrant les peptides amyloïdes, ou Klotho, impliqué dans le vieillissement. Ce métabolite est aussi impliqué dans la réponse apoptotique des neurones en l'absence de facteurs neurotrophiques (Zheng and Koo, 2011). Il a aussi été montré qu'APP était requis comme récepteur cargo aux kinésines pour les vésicules de transport lors du transport axonal (Neve et al., 2000; Zheng and Koo, 2006).

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ainsi que chez les animaux modèles, des peptides A β ont pu être observés aussi bien dans le compartiment extracellulaire que dans le compartiment intracellulaire. La génération de ces peptides se faisant dans les endosomes, il a été supposé que les endosomes contenant les peptides puissent soit fusionner avec la membrane pour libérer des peptides A β dans le milieu extracellulaire, soit rester dans le cytoplasme, ou encore fusionner avec l'appareil de Golgi, ce qui permettrait une accumulation de peptides A β intracellulaires (Figure 21).

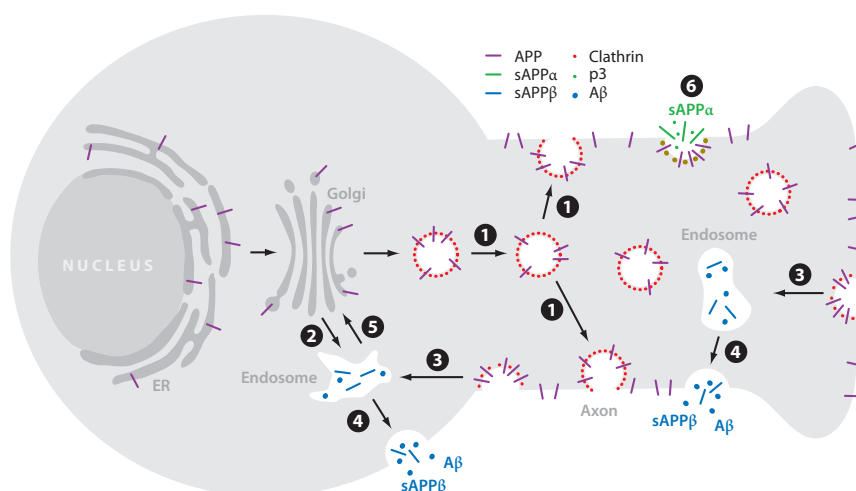


Figure 21 : Trafic et maturation d'APP dans les neurones (O'Brien and Wong, 2011).

APP (en violet) est transporté de l'appareil de Golgi dans l'axone (1) ou dans le compartiment endosomal (2). Après insertion à la membrane cellulaire, une partie de l'APP présent est clivée par l' α -sécrétase (6) pour générer le fragment sAPP α (en vert) qui va diffuser ; alors qu'une autre partie est ré-internalisée dans des endosomes (3) où les fragments A β et sAPP β (en bleu) sont générés. Les endosomes sont recyclés à la membrane cellulaire (4) pour libérer les peptides A β et les fragments sAPP β . Il est possible que des endosomes retournent à l'appareil de Golgi avant que le clivage d'APP n'ait lieu (5).

Concernant l'APP membranaire, il peut se présenter sous la forme de cisdimères à la membrane, et ce dès le réticulum endoplasmique (ER ; Isbert et al., 2011). APP peut aussi former des transdimères entre les membranes de cellules adjacentes, renforçant ainsi l'adhérence et facilitant la plasticité synaptique (Stahl et al., 2014). La formation de ces complexes repose sur la dimérisation des domaines E1 et E2 et requiert le domaine KPI pour les cisdimères (Ben Khalifa et al., 2012) ou le domaine de liaison au cuivre pour les transdimères (Baumkotter et al., 2014).

Sous forme de monomère, il a été proposé qu'APP puisse agir comme un récepteur (Okamoto et al., 1995). L'un des ligands d'APP serait sAPP α , un des métabolites issu de la maturation d'APP : la liaison de sAPP α sur APP permettrait la mise en place de signaux intracellulaires impliqués dans la plasticité synaptique, via la modulation des récepteurs NMDA, ou la survie et la croissance neuronale (Zheng and Koo, 2011). Un autre ligand d'APP serait le peptide amyloïde : sa liaison avec APP faciliterait sa dimérisation et son clivage par la β -sécrétase, créant une boucle de régulation positive de la production de ces peptides (Lorenzo et al., 2000). D'autres ligands putatifs ont été

identifiés comme Netrin1, impliquée dans la guidance axonale, F-Sondin, BRI2 (Zheng and Koo, 2006; 2011)...

c) Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, ou séniles, sont des dépôts extracellulaires hétérogènes principalement constitués de peptides A β . Elles peuvent être marquées par plusieurs colorants : le rouge Congo, la thioflavine S et le bleu de toluidine par exemple. Les peptides A β s'agrègent en feuillets β insolubles, résistants à la protéolyse, et qui peuvent être entourés de plusieurs autres composés, comme l'ApoE, les protéoglycanes et d'autres facteurs démontrant une inflammation environnante.

La toxicité des peptides amyloïdes a poussé à concentrer la recherche sur leur mode de production, d'agrégation et de dégradation.

3) Les peptides A β

a) L'hypothèse de la cascade amyloïde

Il a pu être observé que l'accumulation des peptides A β pour former les plaques séniles suit une distribution particulière selon les zones du cerveau, distribution qui est stéréotypée selon différents stades de la maladie dits de Braak (Braak and Braak, 1991). Pour expliquer l'évolution et les causes de la maladie en fonction de cette distribution des peptides A β , l'hypothèse de la cascade amyloïde a été proposée (Hardy and Selkoe, 2002; O'Brien and Wong, 2011) : l'accumulation et le dépôt des peptides A β sont la cause du développement de la maladie d'Alzheimer et de ses symptômes. Ceux-ci, ainsi que les autres caractéristiques de la maladie comme les neurofilaments de protéines Tau hyperphosphorylées par exemple, sont présentés comme des conséquences de la dérégulation de la quantité de peptides A β : défaut de fonction des synapses, stress oxydatif, altération du rapport d'activité entre les kinases et les phosphatases, mort neuronale. C'est cette hypothèse qui a posé le socle de la majorité des recherches thérapeutiques pour contrer la maladie d'Alzheimer : chercher à diminuer la quantité de peptides A β pour empêcher leur accumulation en augmentant leur dégradation (augmenter les protéases pouvant dégrader ces peptides), en diminuant leur production (diminuer BACE).

Plusieurs études ont étudié le rôle de l'Apolipoprotéine E (ApoE), une glycoprotéine permettant de transporter des lipoprotéines et le cholestérol. En effet, il a été montré que la présence de l'allèle ApoE4 est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer (pour revue, Bekris et al., 2010; Tudorache et al., 2017). L'ApoE peut fixer les peptides A β et permettre leur efflux à travers la barrière hémato-encéphalique ou les adresser aux lysosomes pour qu'ils soient dégradés : plusieurs études ont démontré que l'ApoE3, majoritaire, permet de diminuer la quantité de peptides dans le liquide cérébral alors que l'ApoE4 a une affinité inférieure pour les peptides amyloïdes, ce qui limite leur filtration et favorise leur agrégation (pour revue, Tanzi and Bertram, 2001).

Des agrégats amyloïdes intracellulaires neuronaux ont aussi pu être observés. L'apparition de ces agrégats est corrélée avec l'apparition de troubles cognitifs et comportementaux chez différents modèles animaux (Crowther et al., 2005; Tampellini et al., 2011) et chez l'homme (Gouras et al., 2010).

b) Les autres hypothèses : vers un rôle physiologique des peptides amyloïdes ?

Le rôle toxique des plaques amyloïdes a été largement documenté (Gouras et al., 2014) et par conséquent, le rôle des peptides amyloïdes est généralement considéré comme négatif (agrégation, diminution de la LTP, neurodégénérescence...). En revanche, il n'a pas pu être démontré si la formation des plaques est une cause ou plutôt une conséquence du développement de la maladie d'Alzheimer (Robinson and Bishop, 2002; Puzzo et al., 2015). L'agrégation des peptides A β pourrait initialement être un mécanisme de défense de l'organisme pour faciliter la phagocytose de molécules toxiques, comme des ions métalliques (Robinson and Bishop, 2002). La dérégulation d'un tel mécanisme empêcherait la réalisation de la fonction physiologique des peptides, rendant ces plaques toxiques. Récemment, plusieurs articles ont proposé que les peptides amyloïdes en quantité faibles pourraient aussi avoir un rôle positif. Puzzo et collègues ont montré en 2011 chez la souris qu'une très faible quantité de peptides A β (200 picomolaires) permettait une amélioration de la LTP via une action sur les récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ (Puzzo et al., 2011). Cette découverte pourrait indiquer un rôle physiologique de ces peptides dont la quantité serait dérégulée lors du vieillissement ou de processus pathologiques (augmentation de la production, diminution de la dégradation, diminution des protéines chaperonnes...), ce qui entrainerait des anomalies.

D'autres hypothèses ont été proposées concernant la physiologie d'APP ainsi que sur les causes de la dérégulation de la quantité de peptides A β . En effet, l'augmentation anormale de la production de ces peptides peut donner lieu à une perte de fonction physiologique aussi bien des peptides amyloïdes que de son précurseur APP, et donc de ses autres métabolites, dont la quantité à la membrane diminue lors de la maladie d'Alzheimer, ainsi que des autres produits de maturation d'APP.

Il a aussi été proposé que la dérégulation de la quantité de peptides A β pourrait être la cause d'un accident ischémique qui précipiterait la mort cellulaire observée lors de la maladie d'Alzheimer (Yamashima, 2013; Saito and Ihara, 2014; Yamashima, 2016; Regen et al., 2017).

c) Les autres rôles déjà connus

Il a été montré chez les mammifères que les peptides A β peuvent se lier à la protéine APP et favoriserait sa dimérisation (Lefort et al., 2012). Cela empêcherait la transduction de signaux et favoriserait le clivage protéolytique par BACE1 d'APP, formant ainsi une boucle de régulation positive en augmentant la production de peptides A β (Lorenzo et al., 2000; Scheuermann et al., 2001; Lefort et al., 2012).

4) APPL, l'homologue de hAPP chez la drosophile

a) Découverte du gène APP-Like

En 1989 un gène présentant un fort degré d'homologie avec le gène humain APP est découvert (Rosen et al., 1989). Ce gène code une protéine de 886 acides-aminés qui est plus longue qu'APP. Les domaines extracellulaires E1 et E2 présentent une forte homologie avec les domaines de la protéine humaine (38% et 37% d'identité respectivement). De même, le domaine cytoplasmique de 50 aa présentant 47% d'identité (Figure 22). Ce gène est non-essentiel, ce qui est un grand avantage pour son étude par rapport aux mammifères : il est possible d'étudier des mutants nul, n'exprimant aucun APPL, ce qui permet d'étudier la fonction exacte de ce gène. De plus, il est possible d'étudier séparément son rôle au cours du développement et chez l'adulte ainsi que d'étudier le rôle d'un de ses métabolites grâce aux nombreux outils génétiques disponibles chez la drosophile.

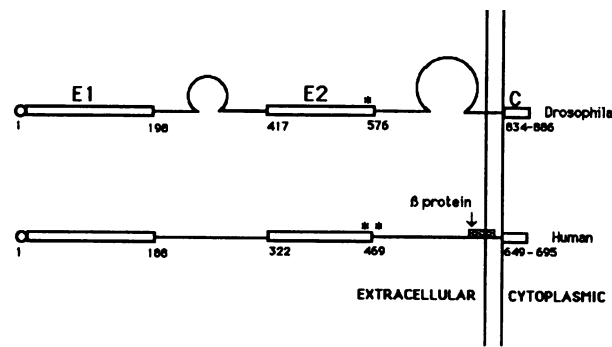


Figure 22 : Schéma comparatif de la structure d'*Appl* de drosophile et d'APP humain (Rosen et al., 1989).

Le gène *Appl* code pour une protéine de 886 acides-aminés (810 aa pour la partie extracellulaire, 53 aa cytoplasmiques en C-ter et 23 aa hydrophobiques transmembranaires). Cette protéine est plus longue qu'APP car les séquences entre les domaines extracellulaires E1 et E2 ainsi qu'entre E2 et le domaine transmembranaire sont plus longues que chez les mammifères.

La délétion du gène *Appl* provoque un défaut de phototaxie qui peut être sauvé par l'expression d'APPL ou de la protéine humaine APP, prouvant ainsi l'homologie fonctionnelle entre les deux protéines (Luo et al., 1992).

Le gène *Appl* est principalement exprimé dans le système nerveux central de la drosophile adulte (Martin-Morris and White, 1990), dans les neurones ainsi que dans deux types de glie : les cellules gliales « astrocyte-like » et la glie corticale (Farca Luna et al., 2017). Il est aussi exprimé dans le système nerveux périphérique chez l'embryon de stades 13 et 14. Chez la larve, APPL est exprimé dans le système nerveux central hormis dans la glie, les cellules mères ganglionnaires et dans les neurones pré-mitotiques.

Deux formes de la protéine APPL ont été identifiées en 1990 (Luo et al., 1990) : une forme membranaire et une forme sécrétée, indiquant ainsi qu'APPL pourrait être maturée de façon similaire à l'APP humaine. Les sécrétases α (Kuzbanian, Rooke et al., 1996), β (dBACE1, Carmine-Simmen et al., 2009) et γ (dPSN, Boulianne et al., 1997; Hong and Koo, 1997) ont été caractérisées chez la drosophile, confirmant qu'APPL subit les mêmes voies de maturation que son homologue APP.

b) Des rôles importants dans le transport axonal et le développement

Le gène *Appl* semble impliqué dans le transport axonal. *Appl* interagit génétiquement avec le gène *Khc* (Kinesin heavy chain) qui code la chaîne lourde de la kinésine,

le moteur antérograde du trafic vésiculaire. De plus, la surexpression d'APPL génère des phénotypes similaires à ceux des mutants Khc (Torroja et al., 1999a). Cette interaction se fait via l'extrémité C-terminale d'APPL, indiquant ainsi un rôle d'APPL comme récepteur vésiculaire pour la kinésine. La localisation d'APPL dans les axones, son transport et celui d'organelles sont dépendants de cette interaction APPL-kinésine (Gunawardena and Goldstein, 2001).

APPL joue aussi un rôle dans le développement de la jonction neuromusculaire (Torroja et al., 1999b). Elle agirait comme un récepteur pour un ligand, ou des ligands, encore inconnu(s), et activerait une cascade de transduction dépendante des petites protéines G_0 . Cette cascade de transduction permettrait la différenciation des boutons synaptiques. Les situations augmentant la quantité d'APPL membranaire, comme la délétion de la séquence d'internalisation ou un niveau élevé d'activité électrique comme chez le mutant Shaker, permettraient la différenciation d'un plus grand nombre de boutons synaptiques.

De plus, l'interaction entre APPL et Notch lors du développement du système nerveux périphérique, au niveau des organes mécano-sensoriels, a aussi été soulignée (Merdes et al., 2004) : APPL pourrait bloquer la liaison de Notch sur son récepteur en séquestrant Notch via le motif NPTY présent sur son domaine extracellulaire.

Enfin, APPL est requise pour le développement normal des lobes α , de façon cellulaire non autonome, et des lobes β , de façon cellulaire autonome (Soldano et al., 2013). Ce rôle se fait en modulant la phosphorylation de Dishevelled (Ddh) par la Protéine Kinase Abelson (Abl) en recrutant cette dernière, ce qui permet d'activer la voie Wnt Planar Cell Polarity (Figure 23).

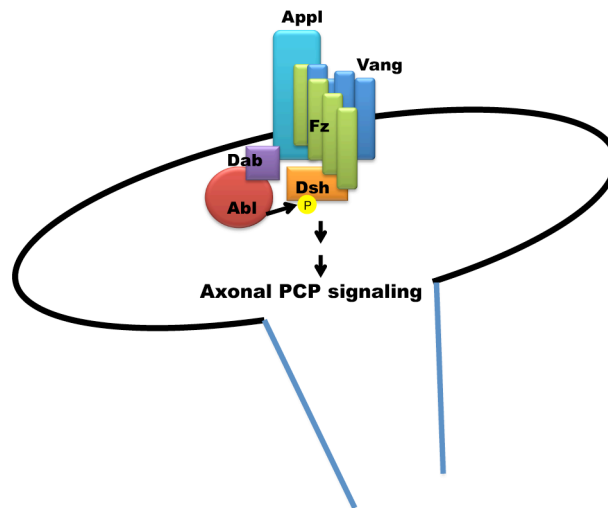


Figure 23 : APPL comme modulateur de la voie de signalisation Wnt-PCP requise pour la guidance axonale (Soldano et al., 2013).

En présence d'un signal Wnt, Fz se lie à Dsh, qui doit être phosphorylé par la kinase Abelson pour se relocaliser correctement à la membrane. APPL ferait partie du complexe membranaire formé par les protéines Fz1 et Vang, et pourrait ensuite recruter la kinase Abl et moduler positivement la phosphorylation de Dsh. L'activation de cette voie de signalisation est requise pour la croissance des axones β des MB.

c) Un rôle dans la mémoire

La présence d'un gène unique *Appl* chez la drosophile simplifie l'étude de sa fonction chez cet organisme. En utilisant des RNAi conditionnels, il a pu être démontré qu'*Appl* est nécessaire dans les MB spécifiquement pour la MTM et la LTM (Goguel et al., 2011; Bourdet et al., 2015b). Bourdet et collègues (2015b) ont montré que le défaut de MTM provoqué par une perte de fonction partielle d'*Appl* pouvait être sauvé par l'expression dans les MB de formes exclusivement membranaire (APPL^{sd}, Torroja et al., 1996), ou sécrétée (APPL^s, Torroja et al., 1996), indiquant ainsi un rôle possible des formes sécrétées comme ligand potentiel des formes membranaires qui activerait les voies de signalisation nécessaires aux effets neurotrophiques et neuroprotecteurs connus de sAPPL (Wentzell et al., 2012).

En revanche, le défaut de LTM provoqué par une perte de fonction partielle d'*Appl* ne peut être sauvé que par la seule surexpression d'APPL sauvage : la surexpression des formes APPL^s ou d'APPL^{sd} ne semble pas suffisante. Même s'il est difficile de conclure de résultats négatifs, l'absence de sauvetage par APPL^s pourrait être expliquée par le fait que dans un contexte génétique exprimant 50% d'APPL, il n'y aurait pas suffisamment

d'APPL membranaire pour transduire les effets d'APPL^s lors de la formation d'une mémoire consolidée, alors qu'il y en a assez pour former la MTM. Dans le cas d'APPL^{sd}, l'absence de sauvetage peut s'expliquer par le fait que d'autres peptides provenant du clivage d'APPL soient nécessaires pour la formation de la LTM : en effet, la surexpression d'APPL^{sd} ne permet pas la production de ces peptides. AICD pourrait ainsi être considéré comme un intervenant puisqu'il peut agir comme un facteur de transcription lié à la mémoire chez les mammifères (Müller et al., 2008).

d) Présence de peptides Aβ chez la drosophile

Jusqu'à récemment, l'existence physiologique de peptides Aβ chez la drosophile n'avait pas pu être démontrée, malgré la présence des enzymes permettant sa production. Par conséquent, de nombreux modèles de la maladie d'Alzheimer chez la drosophile expriment des peptides Aβ humains. L'expression neuronale de peptides Aβ₄₂ chez des jeunes drosophiles provoque des défauts de MTM, ainsi qu'un défaut de STM chez des mouches âgées (Iijima et al., 2004; 2008). De plus, une expression neuronale d'APP humain provoque des défauts d'apprentissage et de mémoire chez de jeunes drosophiles, défauts qui s'aggravent avec l'âge. En effet, hAPP peut être clivé par les sécrétases de la drosophile, ce qui provoque la formation de monomères et d'oligomères de peptides Aβ qui s'accumulent dans le cerveau de la drosophile (Sarantseva et al., 2009).

En 2009, Carmine-Simmen et collègues ont montré qu'en surexprimant soit APPL soit APPL et dBACE, la β-sécrétase de drosophile, il était possible d'observer des agrégats positifs à différents marqueurs amyloïdes (bleu de toluidine, ThioflavinS). Ces agrégats sont aussi marqués par des anticorps anti-Aβ, indiquant ainsi qu'ils sont probablement constitués de peptides Aβ endogènes de drosophile (dAβ) (Carmine-Simmen et al., 2009).

Les auteurs ont voulu confirmer que les peptides dAβ pouvaient former des dépôts en générant des drosophiles exprimant un peptide artificiel dAβ tagué HA (dAβ-HA). Etant donné que la séquence du peptide Aβ n'est pas conservée entre APP et APPL, la séquence d'APPL utilisée correspond à la région des peptides Aβ chez l'Homme. L'expression de ces peptides artificiels provoque des dépôts qui sont colorés par le rouge Congo et la ThioflavinS, et qui réagissent aux anticorps anti-HA. Chez des drosophiles âgées de 30 jours surexprimant APPL, il a aussi pu être observé des

vacuoles, indiquant une neurodégénération, conforme avec les symptômes apparaissant chez les mammifères lors de l'accumulation des peptides A β . Ces résultats indiquent que l'A β de drosophile présente les mêmes caractéristiques que l'A β humain.

Il a aussi pu être montré que la surexpression de ces peptides, de même que la surexpression de dBACE, affecte la MTM lorsqu'elle est combinée avec une perte de fonction partielle d'APPL (Bourdet et al., 2015a). Ce résultat pourrait indiquer une interaction fonctionnelle entre APPL et les peptides amyloïdes.

IV. Néprilysines : protéines de dégradation des peptides A β

1) Les néprilysines de mammifères

Les néprilysines (NEP) sont des endopeptidases majoritairement membranaires, présentes dans tout l'organisme chez les Mammifères, dégradant de petits peptides de moins de 50 acides-aminés (Nalivaeva et al., 2012a, Figure 24). Elles remplissent des rôles très différents dus à leurs nombreux substrats qui varient selon le compartiment dans lequel elles se trouvent (dynorphines, enkephalines, neuropeptide Y, substance P, etc.).

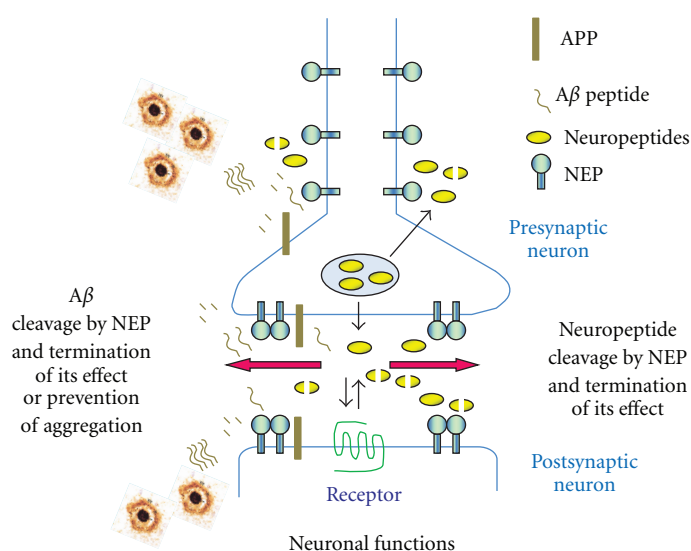


Figure 24 : Représentation schématique de la localisation et de l'activité de NEP dans le cerveau de mammifère (Nalivaeva et al., 2012a).

NEP est localisée en pré et post-synaptique au niveau de la synapse et clive ses peptides substrats, y compris les peptides A β , permettant l'arrêt de leur fonction et donc régulant la réponse cellulaire à ces peptides et la fonction neuronale. La dégradation des neuropeptides par NEP permet d'empêcher leur diffusion hors de la fente synaptique, permettant aussi de restreindre le nombre de synapses activées par la libération de neuropeptides. Dans le cas des peptides A β , NEP permet aussi d'éviter l'accumulation et l'agrégation d'oligomères toxiques.

Les néprilysines sont principalement étudiées dans le cadre des maladies cardiaques (via le système angiotensine, qu'elles peuvent réguler en dégradant l'angiotensine et les endothelines), et en tant que principales enzymes de dégradation des peptides A β . En effet, il a été montré que dans l'hippocampe de souris, Nep est exprimée uniquement

dans les neurones GABAergiques et glutamatergiques et est transportée le long des axones pour s'accumuler aux extrémités axonales. Cette répartition de Nep est inverse à la répartition des zones d'accumulation des peptides amyloïdes et des plaques (Fukami et al., 2002).

Chez l'Homme il a pu être observé que l'expression, la quantité et l'activité des néprilysines diminuait avec l'âge et lors du développement de la maladie d'Alzheimer (Nalivaeva et al., 2012a; Zhou et al., 2013). De plus, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'expression d'APP et de BACE augmente alors que l'expression de Nep diminue dans les régions où les dépôts de peptides amyloïdes apparaissent (Yasojima et al., 2001). Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, il a également été observé que l'expression de Nep diminue dans l'hippocampe au niveau des zones où les peptides A β s'accumulent (Iwata et al., 2002).

Dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, l'augmentation des néprilysines permet de diminuer la quantité de peptides amyloïdes (Poirier et al., 2006; Iwata et al., 2004; Spencer et al., 2008; Meilandt et al., 2009) alors que réciproquement, leur diminution provoque une augmentation des peptides amyloïdes (Hüttenrauch et al., 2015). La dégradation des peptides amyloïdes joue un rôle dans la mémoire puisque dans les modèles murins de la maladie d'Alzheimer, les troubles mnésiques observés sont améliorés par l'augmentation des néprilysines (Poirier et al., 2006; Spencer et al., 2008) et aggravés par leur diminution (Hüttenrauch et al., 2015). Certaines études sont en contradiction avec ces résultats : dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, la surexpression de Nep permet de diminuer la quantité de peptides A β solubles et empêche les dépôts de peptides mais ne parvient pas à diminuer la quantité de trimères ni à améliorer les défauts de mémoire observés (Meilandt et al., 2009).

De nombreux facteurs peuvent jouer sur l'expression, la localisation et l'activité des néprilysines : l'expression et l'activité de Nep sont augmentées par la somatostatine (Saito et al., 2005; Rat et al., 2011), dont la production diminue aussi avec l'âge, ainsi que par les hormones sexuelles (George et al., 2013). La localisation de Nep, et donc sa capacité à dégrader les peptides amyloïdes, peut être régulée par l'état de phosphorylation de son domaine intracellulaire : le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), le NGF (Nerve Growth Factor) et les NT-3 et -4 (Neurotrophine-3 et -4) activent la voie MAPK, ce qui permet à ERK de phosphoryler le domaine intracellulaire de Nep, empêchant ainsi sa localisation à la membrane cellulaire (Kakiya et al., 2012).

Malgré ces connaissances, le rôle de Nep dans la mémoire dans des conditions physiologiques (et non lors du vieillissement pathologique ou dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer) n'a jamais été abordé. Etant donné la diversité de leurs neuropeptides cibles, une étude de leur implication dans la mémoire permettrait de mieux comprendre les mécanismes se mettant en place lors du développement de la maladie d'Alzheimer.

2) Les néprilysines de drosophile

La drosophile exprime 5 néprilysines (et 19 gènes codant pour des protéases néprilysine-like, (Turner et al., 2001) dont 4 sont exprimées dans le cerveau (Tableau 1).

Nom	Membranaire ?	DéTECTABLE dans le cerveau ?
Nep1	Membranaire	DéTECTÉE
Nep2	Constitutivement sécrétée (clivage protéolytique)	DéTECTÉE
Nep3	Membranaire	DéTECTÉE
Nep4	Membranaire et sécrétée (épissage alternatif)	DéTECTÉE
Nep5	Membranaire	Non-déTECTÉE

Tableau 1 : Caractéristiques des 5 Néprilysines exprimées par la drosophile

Les néprilysines de drosophile ont peu été étudiées. Il a été montré qu'elles ont un rôle dans la locomotion (Nep2, Bland et al., 2009), la reproduction (Nep2, Thomas et al., 2005 ; Nep1, Nep2 et Nep4, Sitnik et al., 2014), la physiologie musculaire (Nep4, Panz et al., 2012), la fonction rénale (Nep2, Thomas et al., 2005) ainsi que le métabolisme énergétique et la prise alimentaire (Nep4, Hallier et al., 2016).

Chez la drosophile, les cibles des différentes Nep ne sont pas connues sauf pour Nep4 dont il a été montré que dans le muscle et les cellules gliales associées aux muscles, Nep4 peut dégrader certains peptides régulant l'expression des peptides insuline-like (dilp1, 2, 3, 5) (Hallier et al., 2016).

De façon intéressante, 2 cribles, cherchant à caractériser des protéines modulant les phénotypes causés par l'expression de peptides A β humains, ont identifié Nep2 comme suppresseur de la toxicité de ces peptides (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008).

V. Objectifs de la thèse

Les recherches que j'ai effectuées au cours de ma thèse se concentrent essentiellement sur le rôle des néprilysines et de leurs cibles : l'étude de leur implication dans la mémoire ainsi que celle de deux de leurs cibles potentielles, les peptides amyloïdes et AMN.

1) Les néprilysines ont-elles un rôle dans la mémoire dans des conditions non pathologiques?

Le rôle des néprilysines dans la mémoire a toujours été analysé dans des modèles pathologiques murins (surexpression de peptides A β ou vieillissement). Il a ainsi pu être démontré que les néprilysines avaient un rôle dans ces cas particuliers, probablement en dégradant les peptides A β et en empêchant ainsi leur agrégation et leur effet toxique sur la mémoire.

Pour étudier leur rôle chez des drosophiles jeunes saines, nous avons utilisé des RNAi spécifiques sous le contrôle de drivers inductibles afin d'étudier leur implication dans la mémoire dans des conditions physiologiques. Ainsi, il est possible d'identifier les phases de mémoire impliquées et les structures dans lesquelles ces protéases sont requises. Il s'agit de la 1^e étude du rôle direct des néprilysines dans la mémoire dans des conditions non pathologiques, et aussi de la 1^e étude de leur fonction dans la mémoire chez la drosophile.

2) Les peptides dA β sont-ils une cible des néprilysines pour la formation de la mémoire chez la drosophile ?

Il a été montré qu'un excès de peptides A β est toxique pour les neurones et la mémoire, et inversement une trop faible quantité de peptides pourrait limiter la plasticité synaptique. Il est donc logique de penser que la quantité de peptides A β est très limitée, par la régulation de leur synthèse, et celle de leur dégradation.

De même, on peut supposer que des peptides dA β sont naturellement produits chez la drosophile, mais en si petite quantité qu'ils ne sont pas détectables. Etant donné que les néprilysines humaines, comme les néprilysines de drosophiles, peuvent dégrader les peptides A β humains et que les néprilysines peuvent aussi dégrader les peptides amyloïdes humains, il serait tentant de penser que les néprilysines de drosophiles peuvent dégrader les peptides amyloïdes de drosophiles.

Par conséquent, nous avons donc cherché à vérifier si, chez la drosophile, l'une des néprilysines dégrade-t-elle les peptides dA β pour permettre la formation normale de la mémoire ? Le résultat obtenu pourrait permettre de déterminer l'importance du rôle de ces peptides dans la mémoire ainsi que l'importance de la dégradation de neuropeptides dans la formation de la mémoire.

3) Amnesiac est-il requis chez l'adulte pour la mémoire ?

Waddell et al. (2000) ont montré que l'expression du gène amnesiac est requise spécifiquement dans les neurones DPM pour la MTM. Il est important de noter que cette étude, ainsi que toutes celles qui ont suivi, reposent sur l'utilisation de mutants historiques de ce gène, principalement le mutant amn^{X8}. Par conséquent la temporalité de l'implication du gène amnesiac n'a pas été étudiée. De plus, DeZazzo et al. (1999) ont formulé l'hypothèse que les défauts de mémoire observés chez les mutants amnesiac pourraient être dus à des défauts de développement.

Pour clarifier le rôle d'amnesiac dans la formation de la mémoire chez l'adulte, j'ai utilisé des RNAi et des pilotes d'expression spécifiques et inductibles pour déterminer le rôle d'amnesiac au cours du développement et chez l'adulte. J'ai aussi étudié la question de l'implication d'amnesiac dans la détection de coïncidence, implication qui a jusqu'à présent uniquement été supposée.

Matériel et méthodes

I. Elevage des drosophiles

Les drosophiles sont élevées sur du milieu standard gélosé contenant de la farine de maïs, de la levure, de l'agar, de l'eau et un fongicide. Leur élevage est effectué à 18°C avec une humidité de 60%, sous un cycle d'éclairage 12 h jour/12 h nuit. La souche de référence est la lignée *Canton Special* (CS). Afin de s'affranchir d'éventuelles différences de comportement dues au fond génétique, chaque lignée étudiée est préalablement croisée successivement 3 fois avec la lignée de référence CS, afin d'homogénéiser le fond génétique de l'ensemble des souches. Ainsi, les phénotypes observés peuvent directement être attribués à la mutation étudiée et non à un fond génétique qui ne serait pas en accord avec celui de CS.

II. Souches utilisées

Transgène	Description	Origine	Référence
UAS-Dicer2	CG6493; Augmente l'efficacité d'un RNAi	Bloomington	(Pham et al., 2004)
Amn-RNAi1	CG11937 ; ID v5606	Vienna Drosophila Resource Center (VDRC)	(Aldrich et al., 2010)
Amn-RNAi2	CG11937; ID 25797	Bloomington	
amnX8	CG11937; mutant nul d'amnesiac		(DeZazzo et al., 1999)
RNAi-Nep1A	CG5905; ID 27537	VDRC	(Turrel et al., 2016)

RNAi-Nep1B	CG5894; ID 108860	VDRC	(Turrel et al., 2016)
RNAi-Nep2A	CG9761; ID 23172	VDRC	(Turrel et al., 2016)
RNAi-Nep2B	CG9761; ID 102584	VDRC	(Turrel et al., 2016)
RNAi-Nep3A	CG9565; ID 9565-1	National Institute of Genetics (Japan)	(Turrel et al., 2016)
RNAiNep3B	CG9565; ID 37804	VDRC	(Turrel et al., 2016)
RNAi-Nep4A	CG4058; ID 16669	VDRC	(Turrel et al., 2016)
RNAi-Nep4B	CG4058; ID 100189	VDRC	(Turrel et al., 2016)
UAS-dAβ-HA	Exprime un peptide artificiel dAβ tagué HA	Doris Kretzschmar	(Carmin-Simmen et al., 2009)
UAS-amn	CG11937 Surexprime amnesiac	Scott Waddell	(Waddell et al., 2000)
PNep1	CG5894; ID 22465	Bloomington	
UAS-Nep1	Surexprime la Nep1	Synthétisé au sein du labo	
UAS-Nep1 mutée	Surexprime la Nep1 mutée au niveau du site catalytique	Mutagenèse au sein du laboratoire	
UAS-dBace	CG13095 ; Surexprime dBACE	Doris Kretzschmar	(Carmin-Simmen et al., 2009)

UAS-<i>Appl</i>	CG7727 ; Surexprime <i>Appl</i>		(Torroja et al., 1996; 1999a)
RNAi-<i>Appl</i>	CG7727 ; ID 108312	VDRC	
UAS-GFP::mCD8	Exprime une GFP à la membrane cellulaire		
UAS-AKAR2	Sonde PKA		(Zhang et al., 2001; 2005; Gervasi et al., 2010)
UAS-GCaMP6f	Sonde calcique		
238Y	Driver des MB		(Aso et al., 2009)
VT30559	Driver spécifique des MB	VDRC	(Plaçais et al., 2017)
c739	Driver spécifique des neurones α/β		(Yang et al., 1995)
VT30604	Driver spécifique des neurones primes	VDRC	(Wu et al., 2013; Yang et al., 2016)
VT49483	Driver spécifique des neurones γ	VDRC	
VT64246	Driver spécifique des neurones DPM	VDRC	(Lee et al., 2011)
VT26149	Driver spécifique des neurones DPM	VDRC	

C316	Driver des neurones DPM, des MB et d'autres structures	(Haynes et al., 2015)
-------------	---	--------------------------

Tableau 2 : Liste des transgènes et des mutants utilisés.

Pour obtenir l'UAS-Nep1 mutée, la séquence codante de Nep1 a été clonée dans le vecteur pUAST. Un fragment de restriction de ce vecteur (HindIII - KpnI) a été remplacé par le fragment correspondant contenant la mutation (synthèse du fragment par GenScript). Le vecteur a ensuite été injecté (Rainbow Transgenic Flies, Inc) sur le chromosome 3. La lignée a été outcrossée, soit croisée plusieurs fois pour avoir un fond génétique similaire aux autres lignées utilisées dans notre laboratoire, et finalement amplifiée. La mutation ainsi insérée en position 531 permet d'inactiver le site actif en modifiant un Glutamate (E) en Glutamine (Q) au niveau du motif HExxH (Panz et al., 2012).

Les lignées exprimant deux ou trois transgènes et/ou mutations (par exemple Gal80^{ts};driver ainsi que amn^{x8};UAS-amn ou RNAi-Nep;Dicer2...) ont été générées au sein de l'équipe.

III. Comportement

1) Croisements et élevage

Pour effectuer les expériences de comportement, l'élevage des drosophiles est réalisé à 18°C. Les croisements sont effectués avec environ cinquante femelles vierges et vingt-cinq mâles. Les croisements sont ensuite repiqués 2 fois par semaine afin d'optimiser le niveau de ponte pour disposer de nouveaux individus régulièrement.

2) Conditionnement aversif : préparation

24 heures avant le conditionnement, une centaine de drosophiles âgées de 1-3 jours sont placées sur du milieu frais à 18°C. 30 min avant le début du protocole de conditionnement, les drosophiles sont placées dans les pièces de comportement à 25°C,

et 80% d'humidité ; ceci afin d'éviter l'effet d'un choc de température lors de l'expérience.

Dans les cas où une induction est nécessaire, les drosophiles âgées de 1-3 jours sont placées trois jours à 30°C afin d'induire l'expression du transgène. De plus, pour les tests de mémoire à long-terme, les drosophiles sont placées à nouveau à 30°C entre le conditionnement et le test. Pour les contrôles à basse température, les drosophiles sont placées trois jours à 18°C avant l'expérience.

3) Conditionnement olfactive aversif

Le protocole de conditionnement aversif a été historiquement mis au point au sein du laboratoire de Seymour Benzer (Quinn et al., 1974), puis a été amélioré (Tully and Quinn, 1985; Tully et al., 1994; Pascual and Preat, 2001). Pour le conditionnement, nous disposons de barillets présentant 6 puits dont les parois sont recouvertes de grilles de cuivre (Figure 25). Les barillets étant reliés à un générateur, ces grilles permettront de transmettre des chocs électriques aux drosophiles. Un flux d'air porteur ou non d'odeur peut être injecté dans le barillet grâce à son raccordement à une pompe. Avant le conditionnement, on insère des groupes de 30-40 drosophiles de même génotype par puits de barillet. Un conditionnement automatisé est réalisé grâce à un programme informatique qui contrôle l'envoi des chocs électriques ainsi que l'ouverture des valves permettant l'envoi des flux d'air chargés ou non d'odeurs.

Les odeurs utilisées pour le conditionnement sont les suivantes : 3-Octanol (Sigma-Aldrich) et 4-Méthylcyclohexanol (Sigma-Aldrich) à 0,360 mM et 0,325 mM respectivement. Ces odeurs, naturellement aversives pour les drosophiles, sont diluées dans de l'huile de paraffine (VWR International).

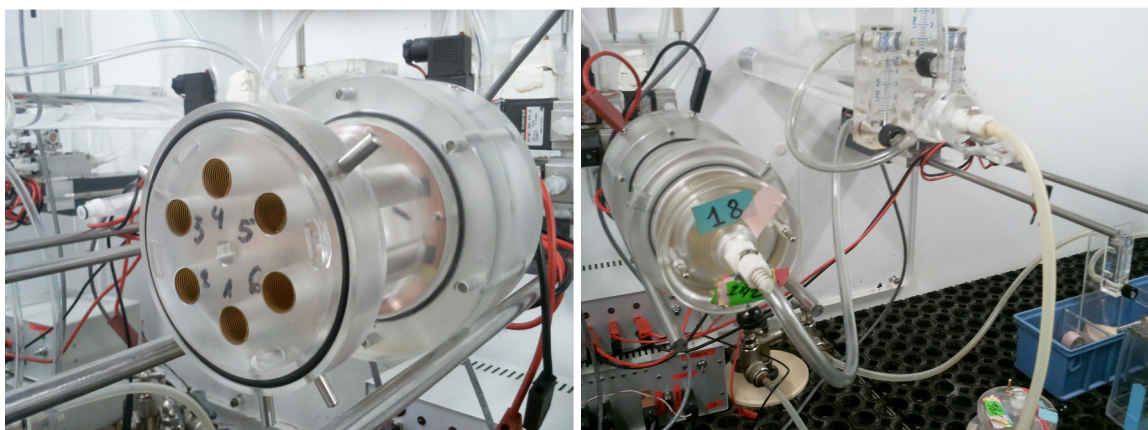


Figure 25 : Les barillets utilisés lors d'un conditionnement aversif.

A gauche, un barillet ouvert présentant les 6 puits disponibles pour conditionner des groupes de mouches. A droite, un barillet fermé et relié au système d'air ainsi qu'au dispositif de chocs électriques.

Un cycle de conditionnement se compose de la manière suivante :

- 90 s d'air,
- 60 s de la première odeur (CS+) associée à l'envoi de 12 chocs électriques de 60 volts se déclenchant 10 s après le début de l'odeur,
- 45 s d'air pour évacuer l'odeur précédente,
- 60 s de la seconde odeur (CS-) mais sans chocs électriques,
- et 45 s d'air.

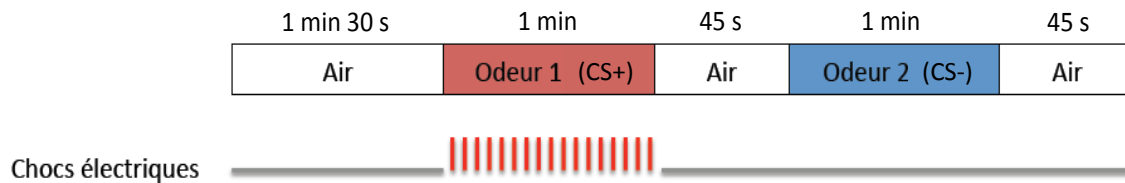


Figure 26 : Schéma d'un cycle de conditionnement aversif.

Pour chaque expérience deux conditionnements successifs et réciproques sont réalisés: un premier groupe de mouches est conditionné avec l'odeur OCT, puis un deuxième groupe de même génotype est conditionné avec l'odeur MCH.

En mémoire aversive, le type de protocole conditionne le type de mémoire formé :

- Un cycle de conditionnement permet d'étudier la mémoire à court-terme (STM), mesurée 1 min après conditionnement, ainsi que la mémoire à moyen terme (MTM), mesurée 2-3 h après conditionnement. Ces mémoires sont composites car elles sont composées d'une part de mémoire labile, et d'autre part de mémoire résistante à l'anesthésie (ARM). L'application d'un choc par le froid (cold-shock) permet d'effacer la partie labile pour ne laisser que la ARM.
- 5 cycles de conditionnement massés permettent de former la ARM à long-terme (LT-ARM), étudiée 24 h après conditionnement.
- 5 cycles de conditionnement espacés de 15 min chacun, permettent de former la mémoire à long terme (LTM) dépendante de la synthèse protéique *de novo*, aussi étudiée 24 h après conditionnement.

4) Tests

Trente minutes avant le test, les drosophiles sont transférées dans la pièce de test à 25°C et 80% d'humidité, à l'exception des tests de MTM, pour lesquels les drosophiles sont conservées dans la pièce de comportement entre la phase de conditionnement et le test. On effectue le test de mémoire dans un T-maze (Tully and Quinn, 1985) relié à deux bouteilles contenant chacune une des deux odeurs utilisées durant le conditionnement. La concentration des molécules odorantes est la même durant la phase de conditionnement et la phase de test. Les drosophiles à tester sont introduites dans la partie centrale coulissante de l'appareil, on relie ensuite l'appareil aux tuyaux pour amener les flux d'air contenant les molécules odorantes (Figure 27). Le test démarre lorsque l'on descend l'ascenseur. Il est effectué pendant une minute dans l'obscurité. Pendant ce test, les drosophiles peuvent librement se diriger vers chacun des deux compartiments (OCT et MCH) présentés de chaque côté de la machine de test. A la fin du test, l'ascenseur est remonté, et les drosophiles présentes dans chaque compartiment sont collectées séparément. Directement après, on teste le deuxième lot de drosophiles conditionnées sur l'autre odeur.

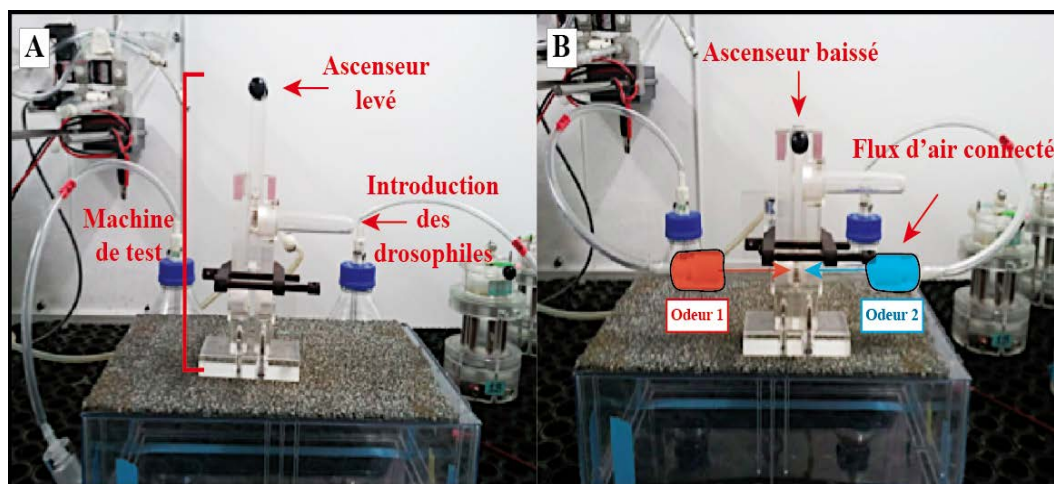


Figure 27 : Dispositif de test utilisé.

A gauche, positionnement du dispositif lors de l'introduction des drosophiles. A droite, positionnement du dispositif lors du test après connexion des deux bouteilles d'odeur à l'appareil en T.

5) Scores de mémoire

L'indice de performance de mémoire (PI) reflète le pourcentage de drosophiles qui se sont déplacées vers le CS⁻ pendant le test. Ce score est une moyenne entre les deux expériences réciproques.

Le score pour chaque expérience réciproque est calculé de la façon suivante:

$$\frac{100 \times (\text{Nombre drosophiles CS}^-) - (\text{Nb drosophiles CS}^+)}{(\text{Nb total de drosophiles})}$$

Nombre drosophiles CS⁻ : nombre de drosophiles présentes dans le compartiment contenant l'odeur non associée aux chocs électriques.

Nombre drosophiles CS⁺ : nombre de drosophiles présentes dans le compartiment contenant l'odeur associée aux chocs électriques.

Les scores peuvent s'étendre de -100 à 100.

Un score de 0 reflète le score de drosophiles naïves, signifiant qu'il y a autant de drosophiles de chaque côté. Un score de 100 signifie que toutes les drosophiles ont évité l'odeur associée aux chocs électriques. Enfin, un score de -100 signifie que les drosophiles ont attribué une valence positive à l'odeur associée aux chocs électriques (CS⁺).

6) Contrôles

a) Tests olfactifs

Il est nécessaire de vérifier que les drosophiles testées ne présentent pas de défaut d'olfaction, ce qui fausserait l'interprétation des phénotypes observés. Ce test est réalisé dans l'appareil en T-maze utilisé pour les tests de mémoire et consiste à laisser le choix aux drosophiles de se déplacer vers un compartiment contenant la molécule odorante répulsive (OCT ou MCH), ou un compartiment rempli par un flux d'air pur. Après une minute de test, les drosophiles de chaque compartiment sont collectées séparément et comptées. Un PI est alors calculé.

b) Tests d'évitement des chocs électriques

De même, il est nécessaire de vérifier que les drosophiles testées ne présentent pas de défaut de sensibilité aux chocs électriques. Ce test consiste à placer les drosophiles au centre de deux barillets, l'un recevant des chocs électriques et l'autre non. Après une minute de test, les drosophiles sont collectées séparément et comptées afin d'établir un PI.

7) Protocoles spécifiques pour étudier certaines formes de mémoire

Pour étudier spécifiquement la MT-ARM, les drosophiles sont soumises 1 h avant le test à un choc par le froid (« cold-shock »), en étant placées dans des tubes à 4°C sur glace.

Pour vérifier que la mémoire observée 24 h après un conditionnement espacé est bien de la LTM, on utilise un inhibiteur de la synthèse protéique cytoplasmique, la cycloheximine (CXM). Les drosophiles sont placées dans des bouteilles normales pendant 2 jours à 30°C puis elles sont transférées dans des tubes Falcon de 15 ml contenant du papier Whatman (« 3M ») sur lequel ont été déposés 125 µL d'une solution de sucrose (5% de sucre) contenant ou pas de la CXM (100 mg dans 10 mL). Les tubes Falcon sont replacés à 30°C pour 17 h. Enfin, les drosophiles sont transférées dans des bouteilles contenant du milieu normal 30 min avant le conditionnement.

8) Analyses statistiques

Pour comparer les scores de deux groupes de drosophiles, nous avons utilisé le test de Student (t-test). Pour la comparaison des scores de plus de deux groupes, nous avons réalisé un test de la variance (ANOVA), suivi s'il est significatif ($p < 0,05$) d'un test à comparaisons multiples de Newman-Keuls. Chaque graphique présenté affiche les indices de performance moyens $\pm$ l'erreur standard de la moyenne (SEM). La moins significative des comparaisons par paires entre le génotype d'intérêt et ses contrôles est indiquée sur le graphe (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 *). La comparaison de trois génotypes ou plus est réalisée avec une ANOVA une-voie suivie d'un test post-hoc à comparaison multiple de Newman-Keuls. La *p-value* globale de l'ANOVA est donnée avec la valeur de la distribution de Fisher $F_{(x,y)}$ où x représente le degré de liberté du nombre de génotypes et y le degré de

liberté de la distribution.

IV. Imagerie neuronale in vivo

La préparation des drosophiles est effectuée selon le protocole déjà décrit (Fiala and Spall, 2003), Figure 28). Une drosophile mâle naïve est collée avec de la colle dentaire biocompatible sur une lamelle en plastique recouverte d'une fine feuille de plastique. 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 DM600.

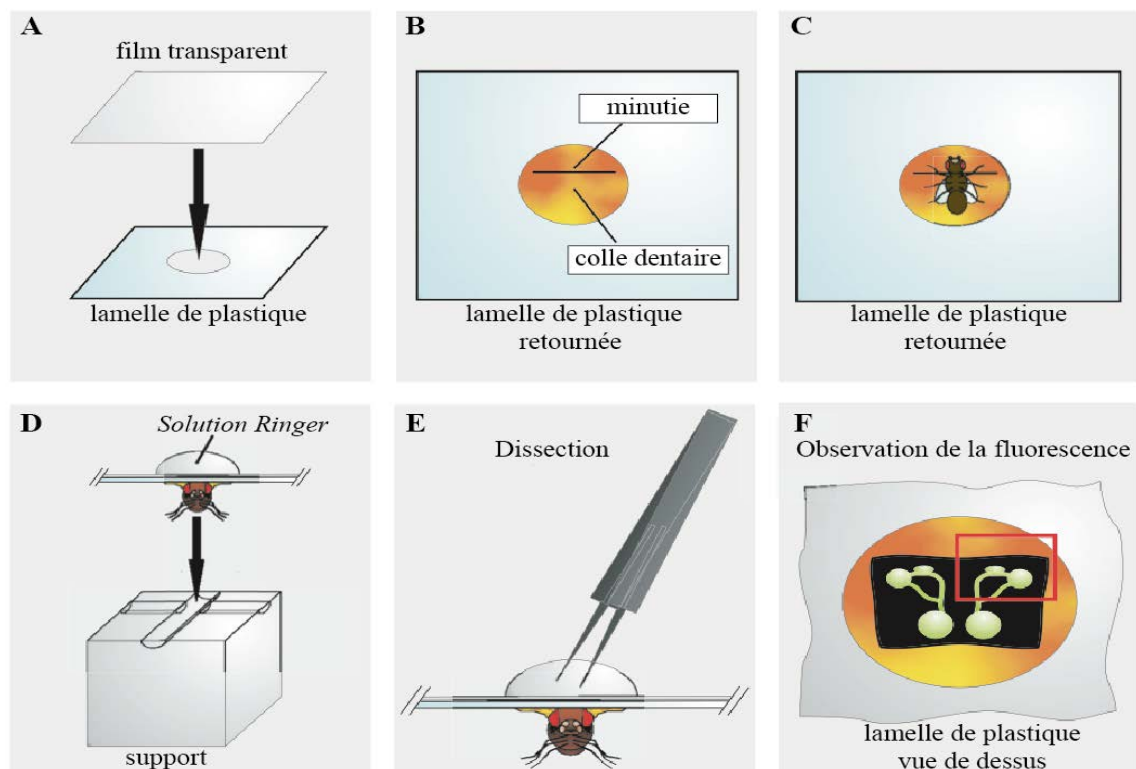


Figure 28 : Représentation schématique de la préparation d'une drosophile pour l'imagerie in vivo.

A. Un film transparent est collé à une lamelle en plastique est appliquée au niveau du trou situé au centre de la lamelle. B. De la colle dentaire est appliquée dans le creux présentant une minutie. C. Une drosophile est collée sur le dos, la tête d'un côté de la minutie et le reste du corps de l'autre côté. D. La lamelle est posée sur la cellule d'imagerie et une goutte de solution *Ringer* est appliquée au niveau de la tête de la

drosophile. E. Le film transparent est découpé, ainsi que la colle dentaire, au niveau de la tête de la drosophile et la cuticule ainsi que les trachées sont retirées. F. La fluorescence peut être observée au microscope.

1) Expériences de perfusion

Les expériences sont réalisées à la température de 20°C. Le cerveau est continuellement perfusé avec de la solution *Ringer*. Les stocks de dopamine (bouteille de 5g de poudre, Sigma-Aldrich) et d'acétylcholine (bouteille de 25 g de poudre, Sigma-Aldrich) sont dilués dans la solution *Ringer* pour atteindre la concentration voulue avant d'être appliqués sur le cerveau. Les produits sont achetés chez Sigma.

2) Imagerie FRET (activité de la PKA, rapporteur AKAR2)

Les images sont acquises à un taux d'une image toutes les 15 s. Pour chaque acquisition 60 images ont été enregistrées. La sonde FRET AKAR2 contient une CFP et un variant de l'YFP. Les spectres d'excitation de la CFP et de l'YFP sont déjà décrits (Zipfel et al., 2003), et une excitation spécifique est obtenue à 850 nm. Les acquisitions sont effectuées grâce au logiciel LAS AF software (Leica).

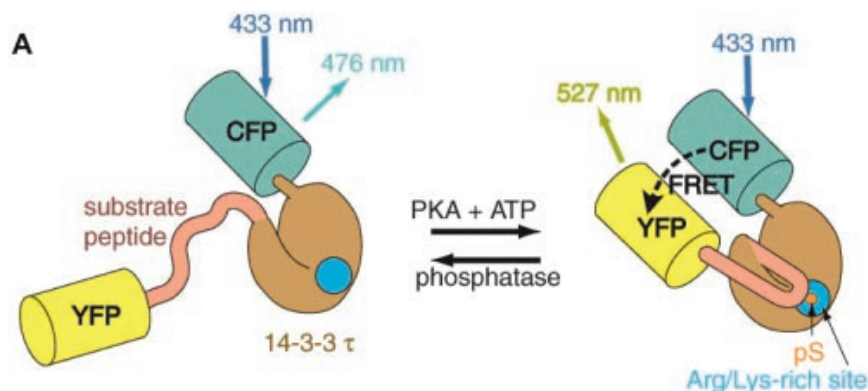


Figure 29 : Représentation simplifiée de la sonde AKAR (Zhang et al., 2001).

La sonde est composée de deux fluorophores, CFP et YFP, reliés par un domaine 14-3-3 τ reconnaissant les protéines phosphorylées et un peptide substrat de la PKA. La sonde est excitée au niveau de la CFP. Sans activité PKA, le peptide substrat de la PKA ne peut interagir avec le domaine reconnaissant les protéines phosphorylées, maintenant les deux fluorophores éloignés. Après phosphorylation par la PKA, le peptide substrat change de conformation et se lie au 14-3-3 τ , permettant un réarrangement

conformationnel des deux fluorophores. L'excitation de la CFP permet un transfert d'énergie vers la YFP qui va fluorescer.

3) Imagerie calcique (rapporteur GCamP3)

Les images sont acquises à un taux d'une image toutes les 15 s. Pour chaque acquisition 60 images ont été enregistrées. L'activité des neurones est reportée par la trace de la variation de fluorescence normalisée $\Delta F/F_0$.

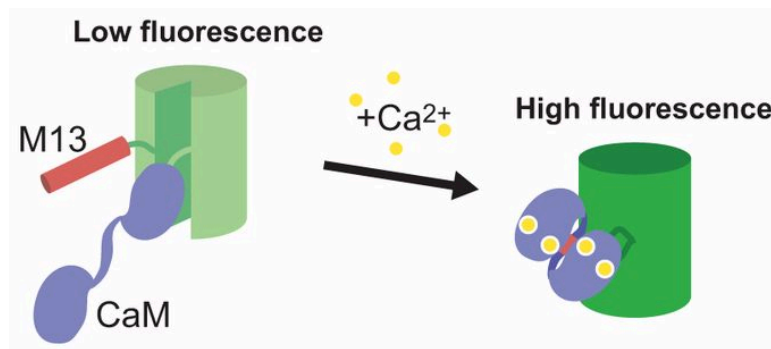


Figure 30 : Représentation simplifiée de la sonde GCamP3 (Sample et al., 2014).

En absence de calcium, la sonde fluoresce faiblement. En présence de calcium, le domaine calmoduline (CaM) se lie au domaine M13, ce qui permet d'augmenter la fluorescence de la GFP.

4) Analyse de l'imagerie

Pour obtenir les ratio FRET dans le temps, on ôte point par point le background des images CFP et YFP (le background est évalué comme l'intensité moyenne d'une région d'intérêt correspondant à une partie non fluorescente du cerveau). L'intensité d'émission YFP et CFP dans une région d'intérêt est moyennée pour chaque image. Ces valeurs sont utilisées pour calculer le ratio d'émission jaune/cyan, qui est ensuite normalisé au ratio précédent l'application de la drogue (baseline). La significativité statistique est déterminée à $p < 0.05$ en utilisant une ANOVA à un facteur avec un test post-hoc de Newman-Keuls. Pour compenser l'effet du photoblanchiment apparaissant au cours des expérimentations, une correction a été apposée aux données. Les données sont montrées comme moyenne $\pm$ SEM.

V. Immunomarquage

1) Analyse du patron généré par les pilotes d'expression

Des mouches de la lignée GAL4 à tester sont préalablement croisées avec des mouches de la lignée *UAS-mCD8::GFP*. Les cerveaux de mouches de la descendance de ce croisement, âgées de 3-4 jours, sont disséqués et fixés pendant 20 min dans une solution de PFA 4% (paraformaldéhyde dilué dans du PBS-T : PBS contenant du Triton X-100 à 0,2%). Les cerveaux sont ensuite lavés 3 x 20 min dans du PBS-T. Après 2 h de blocage dans une solution de BSA à 2% (BSA diluée dans du PBS afin d'éviter la fixation non spécifique des anticorps), les cerveaux sont ensuite incubés pendant une nuit avec les anticorps primaires. Les anticorps primaires sont : monoclonal anti-nc82 (Brunchpilot) de souris (Hybridoma, 1:50) et anti-GFP de lapin (Molecular Probes, 1:250). On procède ensuite à 3 x 20 min de lavage dans la solution de PBS-T, les cerveaux sont ensuite incubés pendant une nuit avec les anticorps secondaires (anti-souris Alexa Fluor 594, ou anti-lapin Alexa Fluor 488, Invitrogen Molecular Probes) dilués au 1:500. Les cerveaux sont à nouveau lavés 3 x 20 min dans du PBS-T et enfin montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage (Prolong, Life Technology). Les préparations ont été observées et scannées avec un microscope confocal A1R de Nikon. Les images des cerveaux obtenues en microscopie confocale ont été ensuite analysées et traitées avec les logiciels Image J (ajustement de la luminosité et du contraste pour une meilleure qualité de l'image).

2) Analyse du défaut de développement des DPM

Le même protocole a été utilisé sur des cerveaux de drosophiles exprimant à la fois *mCD8::GFP* dans les structures à étudier, et un RNAi ou un allèle mutant pour le gène d'intérêt.

VI. Biologie moléculaire

1) Extraction des RNA totaux de têtes de drosophiles

Pour déterminer la capacité d'un RNAi à diminuer les RNA messagers d'un gène, des drosophiles exprimant ce RNAi sous le contrôle d'un driver constitutif ont été élevées à 25°C avant d'être congelées dans de l'azote liquide par groupes de 50 femelles. Dans le cas d'un driver inductible, les drosophiles sont élevées à 18°C puis placées à 30°C pendant 3 jours pour induction avant d'être congelées. En vortexant les tubes dans lesquels les drosophiles sont congelées, il est possible de séparer les têtes des thorax. Les têtes sont alors récoltées grâce à des tamis en inox, placées dans un nouveau tube refroidi, puis broyées à l'aide d'un piston. L'extraction des RNA totaux de ces broyats est réalisée en utilisant le RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La mesure de l'absorbance à 260 nm au spectrophotomètre permet d'établir la concentration des RNA extraits. Les RNA totaux sont conservés à -80°C.

2) Traitement par la DNase

Lorsque cela est nécessaire, les préparations d'RNA totaux sont soumises à un traitement par la DNase afin de dégrader l'ADN génomique présent. Pour cela, les préparations sont incubées avec la DNase I (2 unités, Biolabs) à 37°C pendant 15 min. Après avoir rajouté 2 µL d'EDTA (0,5 M), les échantillons sont incubés à 75°C pendant 10 min afin d'inactiver l'enzyme. Enfin, les échantillons sont purifiés avec le RNA minielute cleanup kit (Qiagen). La concentration des RNA extraits est déterminée après l'étape de DNase.

Cette étape a été réalisée pour l'étude de l'expression des gènes amn et dBACE.

3) Synthèse de cDNA

Pour synthétiser les cDNA, 1,5 µg d'RNA totaux sont utilisés. Les cDNA sont synthétisés en utilisant des oligodT(20) comme amorces. La réaction de transcription reverse est réalisée avec le kit Superscript III (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les cDNA sont conservés à -20°C.

4) Protocole de « Polymerase Chain Reaction » quantitative (qPCR)

Les niveaux d'expression des transgènes ou des gènes d'intérêt sont estimés par la mesure en temps réel de la fluorescence d'un fluorophore (SYBR Green I Master, Roche) incorporé lors des étapes d'amplification d'cDNA. Cette amplification et la mesure de la fluorescence sont automatisées grâce au Light Cycler 480 (Roche).

L'amplification est réalisée en utilisant des plaques de 96 puits avec un volume final de réaction de 10 µl (concentration des amorces à 0,5 µM).

Le programme se déroule comme suit :

- une étape de dénaturation préliminaire à 95°C pendant 5 min
- 40 cycles comportant une étape d'hybridation-amplification à 60°C de 30 s et une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 s
- une étape finale à 95°C permet de déterminer la courbe de fusion des amplicons afin d'estimer leur taille et leur spécificité.

Chaque cDNA est analysé en triplicat avec deux dilutions différentes (1/50ème et 1/100ème).

Le logiciel Light Cycler 480 (Roche) détermine automatiquement le « crossing point » (Cp) de chaque réaction. Le Cp est inversement proportionnel à la quantité d'cDNA initial : il correspond au cycle où la fluorescence atteint le maximum de la dérivée seconde de la courbe d'amplification au terme des 40 cycles. Le Cp moyen de chaque triplicat est utilisé pour calculer un ratio d'expression $2^{-\Delta Cp}$ où $\Delta Cp = Cp \text{ gène d'intérêt} - Cp \text{ tubuline}$, la tubuline α (CG1913) servant de gène de référence. Les ratios d'expression servent pour les analyses statistiques, ils peuvent être normalisés par rapport à un génotype de référence pour des comparaisons quantitatives.

Transcrit amplifié	Amorce	Séquence de 5' -> 3'
Nep1 CG5905	Sens F960	ATTTGCATGACCCAGGAGTG
	Anti-sens R1015	CAGGGATCGGAGTTGAGGT
Nep2 CG971	Sens F1588	ACATCGCCACCAGCAGTC
	Anti-sens R1682	ACGTTGCGGATTTTCGTTG
Nep3 CG9565	Sens F249	TGCAGATACGCTACCACACC

	Anti-sens R342	CAGCGTAAAGATCGTGATGG
Nep4 CG4058	Sens F2628	GCATTATTGCCCAATATAGCAACT
	Anti-sens R2700	CCATTGTCTGCGATATTCTCAC
Amn CG22937	Sens F2567	ACATGCGCAGTTTTTGTGT
	Anti-sens R2609	AACAGTAATACGCAGTGCAACG
dBACE CG13095	Sens F499	ACCTTTGCTGAATCCACCAAC
	Anti-sens R598	TTGTAGAACGGAGGAGCCAC
APPL CG7727	Sens F1499	AGTACCAGGACATGCGCCTA
	Anti-sens R1572	TCGAGTGCCTGAACAGAAGTC
dA β -HA	Sens APPL-F2607	CCGCAACGTCTACTTCACG
	Anti-sens HA-R	GTAATCGGGCACATCGTAGG
Tubuline α CG1913	Sens F169	TTGTCGCGTGTGAAACACTTC
	Anti-sens R229	CTGGACACCAGCCTGACCAAC

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les qPCR.

Liste des couples d'oligonucléotides utilisés pour amplifier les différents transcrits étudiés. Pour étudier les gènes amn et dBACE, une étape de DNase a été rajoutée.

5) Western Blot

a) Extraction par fractionnement des protéines

Pour analyser la quantité de peptides A β , 50 drosophiles femelles sont placées 48 h à 30°C pour permettre l'induction des transgènes sous le contrôle du pilote d'expression pan-neuronal *tub-Gal80^{ts};elav*. Nous avons extrait les protéines totales de têtes des drosophiles par fractionnement en suivant le protocole établi dans Burnouf et al. (2015) pour séparer les protéines solubles des protéines membranaires.

b) Western Blot

Les protéines solubles sont séparées sur gel SDS-PAGE contenant un gradient de 10 à 20% d'acrylamide (NovexTM 10-20% Tricine, Life Technologies) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Les membranes sont coupées en deux parties : la partie inférieure est incubée avec l'anticorps anti-HA (ab130275, Abcam, 1:10,000 dilution), et la partie supérieure est incubée avec l'anticorps anti- α -Tub (T6199, Sigma-Aldrich, 1:40,000 dilution). Le système ECL (Life Technologies) est

utilisé pour la révélation. Le niveau des protéines est quantifié grâce au logiciel ImageQuant TL (GE Healthcare) et exprimé comme un ratio relatif à l' α -Tub.

Résultats

I. Article : *Drosophila* neprilysins are involved in middle-term and long-term memory

Introduction

Les néprilysines sont des protéases principalement connues pour leur rôle dans les maladies cardiaques et leur rôle neuroprotecteur lors de la maladie d'Alzheimer. En effet, ces enzymes peuvent cliver de nombreux peptides : les angiotensines et les peptides natriurétiques impliqués dans la physiologie cardiaque et les peptides amyloïdes (A β) impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Concernant leur fonction dans la mémoire, elle n'a été étudiée que dans des modèles de la maladie d'Alzheimer ou chez des animaux âgés. Ces études ont permis de mettre en évidence une possible implication dans la mémoire puisque dans des modèles murins, diminuer l'expression des néprilysines aggrave les déficits mnésiques alors que l'augmenter améliore les défauts de mémoire, en modulant la quantité de peptides amyloïdes.

La drosophile exprime 4 néprilysines dans le cerveau, dont certaines ont déjà été étudiées dans d'autres organes pour diverses fonctions (physiologie musculaire, locomotion, reproduction, métabolisme...). En utilisant la drosophile comme modèle, nous avons pu étudier la fonction mnésique des néprilysines chez des jeunes adultes dans des conditions physiologiques.

Résultats principaux

Nous avons pu montrer que toutes les néprilysines de drosophile sont requises dans la mémoire et spécifiquement dans la MTM et la LTM. Ces enzymes exercent leur fonction dans les Mushroom Body (MB), le centre de la mémoire, ainsi que dans deux neurones, les neurones Dorsal Paired Medial (DPM).

Nous avons montré que 1) dans les MB, Nep1 a un rôle dans la MTM et la LTM, alors que Nep2, Nep3 et Nep4 ont un rôle redondant spécifiquement lors de la formation de la LTM ; 2) dans les neurones DPM, les 4 néprilysines sont requises dans la MTM et Nep1, Nep3 et Nep4 sont requis pour la LTM.

Ces résultats mettent en exergue le fait que la protéolyse de neuropeptides, pour terminer leur action, soit nécessaire pour permettre la formation normale de la mémoire.

Article

Drosophila Neprilysins Are Involved in Middle-Term and Long-Term Memory

Oriane Turrel, Aurélie Lampin-Saint-Amaux,  Thomas Pr  at, and  Valérie Goguel

Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, Centre National de la Recherche Scientifique, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 75005 Paris, France

Neprilysins are type II metalloproteinases known to degrade and inactivate a number of small peptides. Neprilysins in particular are the major amyloid- β peptide-degrading enzymes. In mouse models of Alzheimer's disease, neprilysin overexpression improves learning and memory deficits, whereas neprilysin deficiency aggravates the behavioral phenotypes. However, whether these enzymes are involved in memory in nonpathological conditions is an open question. *Drosophila melanogaster* is a well suited model system with which to address this issue. Several memory phases have been characterized in this organism and the neuronal circuits involved are well described. The fly genome contains five neprilysin-encoding genes, four of which are expressed in the adult. Using conditional RNA interference, we show here that all four neprilysins are involved in middle-term and long-term memory. Strikingly, all four are required in a single pair of neurons, the dorsal paired medial (DPM) neurons that broadly innervate the mushroom bodies (MBs), the center of olfactory memory. Neprilysins are also required in the MB, reflecting the functional relationship between the DPM neurons and the MB, a circuit believed to stabilize memories. Together, our data establish a role for neprilysins in two specific memory phases and further show that DPM neurons play a critical role in the proper targeting of neuropeptides involved in these processes.

Key words: dorsal paired medial neurons; *Drosophila*; long-term memory; mushroom bodies; neprilysin; olfactory conditioning

Significance Statement

Neprilysins are endopeptidases known to degrade a number of small peptides. Neprilysin research has essentially focused on their role in Alzheimer's disease and heart failure. Here, we use *Drosophila melanogaster* to study whether neprilysins are involved in memory. *Drosophila* can form several types of olfactory memory and the neuronal structures involved are well described. Four neprilysin genes are expressed in adult *Drosophila*. Using conditional RNA interference, we show that all four are specifically involved in middle-term memory (MTM) and long-term memory (LTM) and that their expression is required in the mushroom bodies and also in a single pair of closely connected neurons. The data show that these two neurons play a critical role in targeting neuropeptides essential for MTM and LTM.

Introduction

Neprilysin proteins are zinc-dependent endopeptidases that inactivate small peptides. They are mainly type II integral membrane proteins, although in rare cases they can be cleaved or

secreted. Their active site faces the extracellular space and they can be present at presynaptic sites (Fukami et al., 2002; Iwata et al., 2004). Neprilysins play a key role in brain function by terminating neuropeptide signaling at the cell surface (Turner, 2003) and have been identified in various tissues in various organisms, indicating evolutionarily conserved functions. They are involved in many neuronal processes from axonal regeneration and synaptic plasticity to neuroinflammation and, at the behavioral level, have been implicated in motor function, anxiety, circadian rhythms, and sleep (Nalivaeva et al., 2012a).

Neprilysins are also the major amyloid- β (A β) peptide-degrading enzymes (Nalivaeva et al., 2012a; Marr and Hafez, 2014) and, as such, are thought to be key to Alzheimer's disease (AD), in which the first symptom is a loss of memory. AD brains show decreased levels of neprilysin expression and activity (Yasojima et al., 2001; Caccamo et al., 2005; Wang et al., 2010; Zhou et al., 2013). In murine models of AD, neprilysin overexpression

Received Oct. 12, 2015; revised July 4, 2016; accepted July 25, 2016.

Author contributions: T.P. and V.G. designed research; O.T., A.L.-S.-A., and V.G. performed research; O.T., T.P., and V.G. analyzed data; O.T. and V.G. wrote the paper.

T.P. received grant support from the French Agence Nationale de la Recherche (11BSV40071) and the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20140329540). O.T. received support from the Fonds de l'ESPCI-Georges Charpak. We thank Honorine Lucchi for technical help and all of the members of our laboratory for valuable discussions and for critically reading this manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: valerie.goguel@espci.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3730-15.2016

Copyright    2016 the authors 0270-6474/16/369535-12\$15.00/0

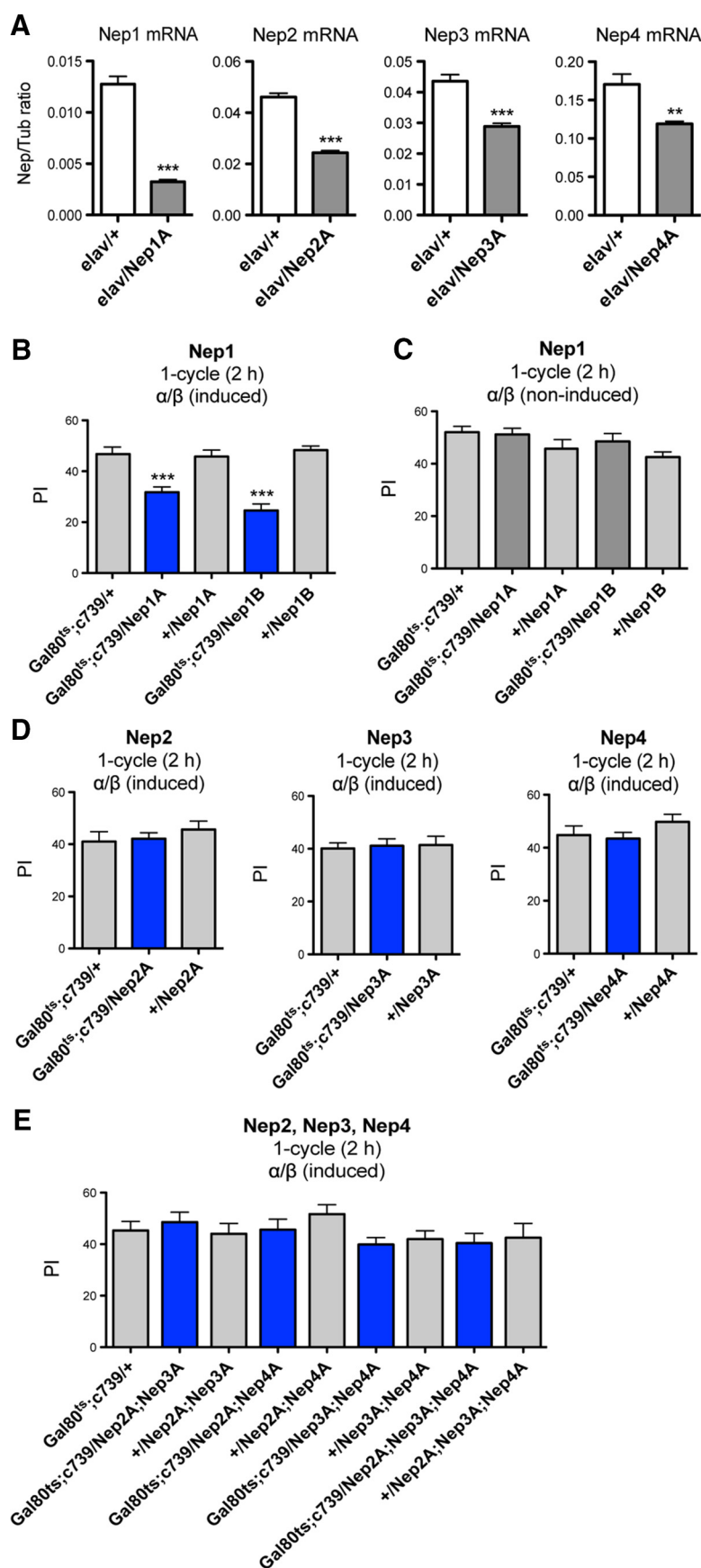


Figure 1. *Nep1* inhibition in the adult α/β MB neurons induces a MTM deficit. **A**, Neprilysin mRNA is targeted efficiently by RNAi-Nep constructs. Shown are qPCR analyses of neprilysin expression. Total RNA was extracted from *elav/+* and *elav/RNAi-Nep* fly heads and further reverse transcribed with oligo(dT) primers. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a

attenuates memory deficits (Poirier et al., 2006; Spencer et al., 2008; Park et al., 2013), whereas neprilysin deficiency aggravates the behavioral phenotypes (Hüttenrauch et al., 2015). It has also been shown that neprilysin inhibition improves memory in aged mice, an effect that is not mediated through A β degradation (Walther et al., 2009). Nalivaeva et al. (2012b) showed that administration of valproic acid, which can upregulate neprilysin expression, could restore neprilysin activity and memory deficit caused by prenatal hypoxia in adult rats, which points to a role in memory. However, whether neprilysin is involved in memory in nonpathological situations is still an open question.

To find out whether neprilysin is required for memory in physiological conditions, we used *Drosophila melanogaster*, a model organism that allows efficient conditional silencing in selected neuronal structures. The fly genome contains five neprilysin-encoding genes (Bland et al., 2008). Neprilysins 1–4 (Nep1–4) are expressed in all developmental stages, whereas Nep5-specific transcripts are undetectable, indicating that this gene is only marginally expressed, if at all, in *Drosophila* (Chintapalli et al., 2007; Meyer et al., 2011). Nep1 is the fly ortholog of human neprilysin (hNEP) (Turner et al., 2001). Catalytic activity has been demonstrated for two *Drosophila* neprilysins, Nep2 (Thomas et al., 2005; Bland et al., 2007) and Nep4 (Meyer et al., 2009).

reference. Results are shown as ratios to the reference (Nep1: *t* test, ****p* < 0.0001, *n* = 4; Nep2: *t* test, ****p* < 0.0001, *n* = 6; Nep3: *t* test, ****p* = 0.0008, *n* = 4; Nep4: *t* test, ***p* = 0.0094, *n* = 4). **B**, **C**, *Nep1* expression in adult α/β MB neurons is involved in MTM. **B**, After 3 d of induction, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* and */Nep1B* flies exhibit MTM deficits ($F_{(4,45)} = 20.98$, *p* < 0.0001, *n* $\geq$ 8; post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* vs *Gal80^{ts};c739/+* ****p* < 0.001, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* vs *+Nep1A* ****p* < 0.001, *Gal80^{ts};c739/Nep1B* vs *Gal80^{ts};c739/+* ****p* < 0.001, *Gal80^{ts};c739/Nep1B* vs *+Nep1B* ****p* < 0.001). **C**, In the absence of Gal4 induction, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* and */Nep1B* flies exhibit similar MTM scores to their respective genetic controls ($F_{(4,64)} = 2.039$, *p* = 0.1003, *n* $\geq$ 11). **D**, **E**, *Nep2*, *Nep3*, and *Nep4* silencing in adult α/β MB neurons does not alter MTM. **D**, Single *Nep* knock-down MTM analyses with the *Gal80^{ts};c739* driver. RNAi-expressing flies show similar MTM scores to the genetic controls (*Nep2A*: $F_{(2,26)} = 0.5832$, *p* = 0.5658, *n* = 9; *Nep3A*: $F_{(2,26)} = 0.06404$, *p* = 0.9381, *n* = 9; *Nep4A*: $F_{(2,25)} = 1.233$, *p* = 0.3100, *n* $\geq$ 8). **E**, Analyses of double and triple *Nep* knock-down with the *Gal80^{ts};c739* driver. RNAi-expressing flies show similar MTM scores to their genetic controls ($F_{(6,106)} = 1.250$, *p* = 0.2874, *n* $\geq$ 10). Error bars indicate mean $\pm$ SEM. PI, Performance index.

The fly brain, despite its relative simplicity, is highly structured and can drive sophisticated behaviors. It is extensively used as a model to study memory. The molecular mechanisms underlying memory are conserved from flies to mammals and the neuronal structures involved are well described (Heisenberg, 2003). In particular, the mushroom bodies (MBs) are known as the central integrative brain structure for olfactory memory (de Belle and Heisenberg, 1994; Gerber et al., 2004; Krashes et al., 2007). The MB is a bilateral structure composed of 4000 intrinsic neurons called Kenyon cells that are classed into three different subtypes with axons that form two vertical (α and α') and three medial (β , β' and γ) lobes (Crittenden et al., 1998).

Here, we address the role of Nep1–4 in memory using conditional RNA interference (RNAi) in healthy young flies. We show that each neprilysin expressed in the adult fly is specifically involved in the formation of middle-term memory (MTM) and long-term memory (LTM). Interestingly, we found that the expression of each neprilysin is required in the MB and also in a single pair of large neurons, the dorsal paired medial (DPM) neurons (Waddell et al., 2000). DPM neurons are known to innervate all of the MB lobes broadly and mediate the consolidation of memories (Keene et al., 2004). Our data thus show that DPM neurons play a key role in the degradation of neuropeptides, a critical process for sustaining MTM and LTM.

Materials and Methods

Drosophila stocks. *Drosophila* wild-type strain Canton Special (CS) and mutant flies were raised on standard medium at 18°C in 60% humidity in a 12 h light/dark cycle. All strains used for memory experiments were outcrossed to the CS background. RNAi-Nep lines were obtained from the Vienna *Drosophila* Resource Center (Austria) for RNAi-Nep1 (Nep1A: 27537, Nep1B: 108860), RNAi-Nep2 (Nep2A: 23172, Nep2B: 102584), RNAi-Nep3 (Nep3B: 37804) and RNAi-Nep4 (Nep4A: 16669, Nep4B: 100189) and from the National Institute of Genetics (Japan) for RNAi-Nep3 (Nep3A: 9565-R1). The UAS-Dicer2 line (24650) was obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University, National Institutes of Health P40OD018537). Gal4 drivers were used to achieve RNAi expression. The *elav-Gal4* driver was used for pan-neuronal expression, *tubulin-Gal80^{ts};238Y* (*Gal80^{ts};238Y*) for conditional expression in the MB, *tubulin-Gal80^{ts};c739* (*Gal80^{ts};c739*) for conditional expression in α/β neurons, *MB247-Gal80^{ts};c316* (*MB-Gal80^{ts};c316*) and *VT64246* (Vienna *Drosophila* Resource Center, Austria) for constitutive expression in DPM neurons, and *tubulin-Gal80^{ts};VT64246* (*Gal80^{ts};VT64246*) for conditional expression in DPM neurons. To induce RNAi expression specifically in adults, the TARGET system was used as described by McGuire et al. (2003); flies were kept at 30°C for 3 d before conditioning, and also until memory test for anesthesia-resistant memory (ARM) and LTM analyses.

Behavioral experiments. Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described by Pascual and Pr  at (2001). Training and testing were performed at 25°C in 80% humidity. Conditioning was performed on samples of 25–35 flies 3–4 d old with 3-octanol (~95% purity; Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol (99% purity; Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International). Memory tests were performed with a T-maze apparatus (Tully and Quinn, 1985). Flies were given 1 min to choose between 2 arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the sum of flies in both arms. The average of two reciprocal experiments gave a performance index. For odor avoidance tests after electric shock and response to electric shock, flies were treated as described by Pascual and Pr  at (2001). To analyze consolidated memory, before five-spaced conditioning, groups of 40 flies were placed for 17 h at 30°C in feeding tubes (Falcon 2017) containing Whatman filter paper strip (1.0 × 2.5 cm) soaked with a total 125 μ l of sucrose solution (5%, Sigma-Aldrich) with or without cycloheximide (CXM, 35 mM;

Table 1. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing RNAi-Nep1A or RNAi-Nep1B in adult α/β neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};c739/+</i>	74.88 ± 3.953	55.44 ± 4.193	46.06 ± 3.738
<i>Gal80^{ts};c739/Nep1A</i>	77.38 ± 4.637	59.00 ± 5.568	42.50 ± 4.826
<i>+ /Nep1A</i>	79.88 ± 4.286	51.00 ± 6.614	46.38 ± 4.728
<i>Gal80^{ts};c739/Nep1B</i>	79.75 ± 6.135	54.00 ± 6.094	45.25 ± 3.867
<i>+ /Nep1B</i>	73.38 ± 5.161	59.25 ± 6.619	52.00 ± 4.342

Data are shown as means ± SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(4,47)} = 0.3371$, $p = 0.8515$, $n \geq 8$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(4,47)} = 0.3231$, $p = 0.8610$, $n \geq 8$) and methylcyclohexanol ($F_{(4,47)} = 0.5304$, $p = 0.7140$, $n \geq 8$) is impaired in flies expressing RNAi-Nep1A or Nep1B under the control of the *Gal80^{ts};c739* driver.

Sigma-Aldrich). Flies were transferred to standard food vials 30 min before training. After training, flies were kept in standard food vials at 30°C for 24 h until memory tests were performed.

Quantitative PCR analyses. Flies were raised at 25°C before total RNA extraction from 50 female heads using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Samples were reverse-transcribed with oligo(dT)20 primers using the SuperScript III First-Strand kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Level of the target cDNA was compared against level of α -Tub84B (Tub, CG1913) cDNA, which was used as a reference. Amplification was performed using a LightCycler 480 (Roche) and the SYBR Green I Master mix (Roche). Reactions were performed in triplicate. The specificity and size of amplification products were assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis, respectively. Expression relative to reference is expressed as a ratio ($2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the crossing point).

Statistical analyses. Memory scores are displayed as mean ± SEM. Quantitative mRNA measurements were analyzed from $2^{-\Delta C_p}$ using Student's *t* tests, with significance threshold set at $p \leq 0.05$. For behavioral experiments, scores resulting from all genotypes were analyzed using one-way ANOVA followed, if significant at $p \leq 0.05$, by Newman–Keuls multiple-comparisons tests. The overall ANOVA *p*-value is given in the legends, along with the value of the corresponding Fisher distribution $F_{(x,y)}$, where *x* is number of degrees of freedom for groups and *y* is total number of degrees of freedom for the distribution. Asterisks on the figure denote the least significant of the pairwise *post hoc* comparisons between the genotype of interest and its controls following the usual nomenclature.

Results

Nep1 expression is required in the adult MB for MTM

The fly expresses four neprilysins, Nep1–4 (Meyer et al., 2011), one of which, Nep1, was shown to be expressed in the MB (Sitnik et al., 2014). To analyze the potential involvement of fly neprilysins in memory, we used the classical conditioning of an odor-avoidance response. In this paradigm, groups of flies are successively exposed to two distinct odors, only one of which is associated with electric pulses. Distinct phases of associative aversive memory can then be differentiated (Isabel and Pr  at, 2008; Bouzaiane et al., 2015). Learning is assessed immediately after a single conditioning, whereas MTM is assessed 2 h later. The fly can also produce two antagonistic forms of consolidated memory: ARM is formed after five massed cycles of conditioning, whereas the robust LTM is only formed after five cycles spaced at 15 min rest intervals. Crucially, LTM is the only memory phase dependent on *de novo* protein synthesis (Tully et al., 1994).

To assess the involvement of neprilysins in memory, neprilysin expression was knocked down using RNAi-mediated silencing. The efficiency of four RNAi constructs targeting Nep1, Nep2, Nep3, and Nep4, respectively, was assessed using the pan-neuronal *elav-Gal4* driver (*elav*) (Brand and Perrimon, 1993). Neprilysin expression in fly heads was quantified by real-time PCR. The expression of each specific RNAi construct (*elav/Nep*)

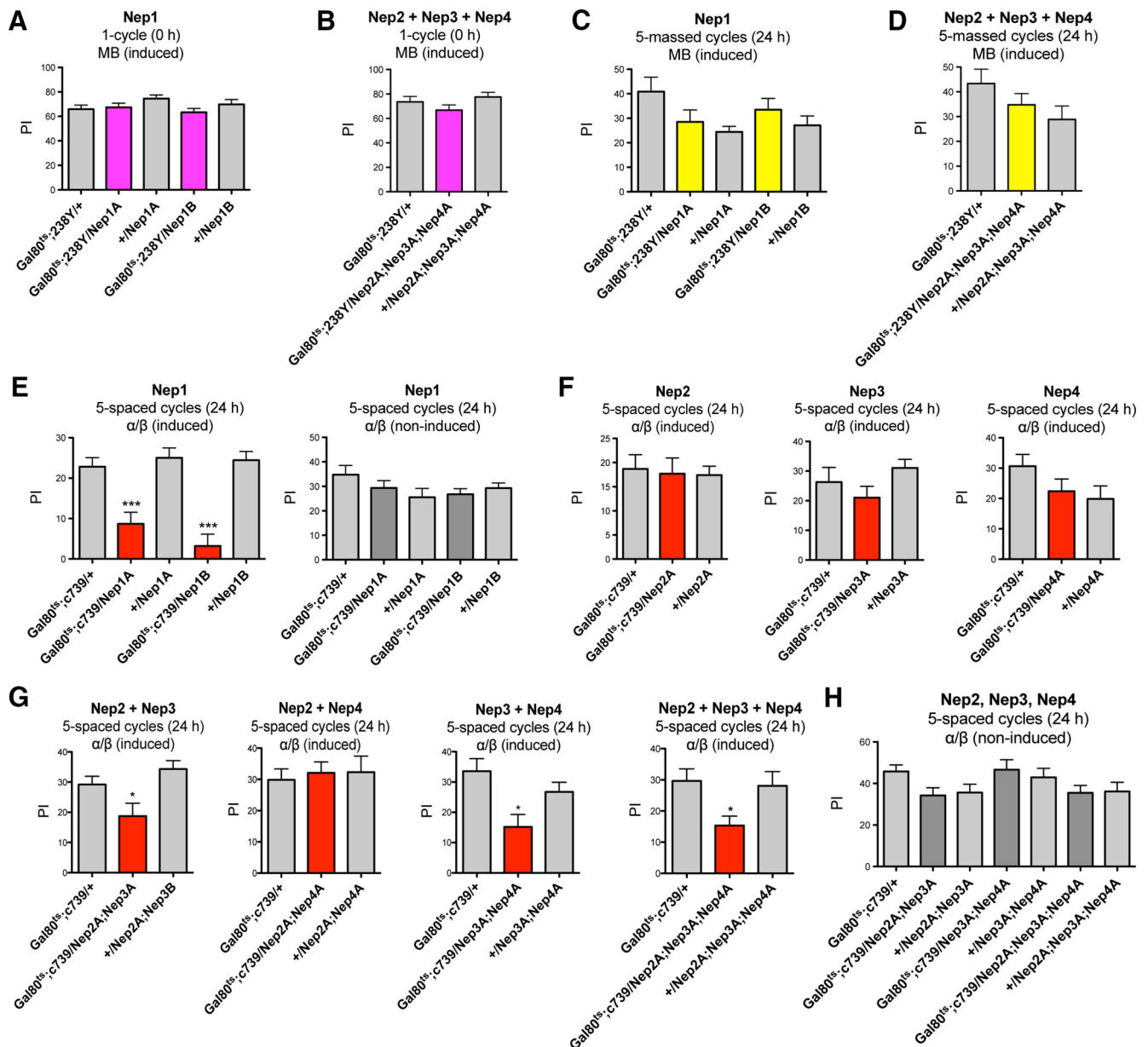


Figure 2. Neprilysin inhibition in the adult MB induces LTM deficits. **A, B,** Neprilysin silencing in the adult MB does not affect learning. **A,** *Gal80^{ts};238Y/Nep1A* and */Nep1B* flies exhibit similar learning scores to the genetic controls ($F_{(4,49)} = 1.591, p = 0.1932, n = 10$). **B,** Concomitant silencing of Nep2, Nep3, and Nep4 does not affect learning. *Gal80^{ts};238Y/Nep2A/Nep3A/Nep4A* flies exhibit similar learning scores to the genetic controls ($F_{(2,27)} = 1.681, p = 0.2066, n \geq 9$). **C, D,** Neprilysin silencing in the adult MB does not impact ARM. **C,** *Gal80^{ts};238Y/Nep1A* and */Nep1B* flies exhibit similar memory scores to the genetic controls ($F_{(4,73)} = 2.075, p = 0.0934, n \geq 14$). **D,** Concomitant silencing of Nep2, Nep3, and Nep4 does not affect ARM. *Gal80^{ts};238Y/Nep2A/Nep3A/Nep4A* flies exhibit similar ARM scores to the genetic controls ($F_{(2,41)} = 1.929, p = 0.1589, n = 14$). **E–H,** LTM analyses. **E,** Nep1 expression is required in adult α/β neurons for LTM formation. After induction, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* and */Nep1B* flies exhibit a strong LTM impairment ($F_{(4,54)} = 14.36, p < 0.0001, n \geq 9$; post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* vs *Gal80^{ts};c739/+* *** $p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* vs */Nep1A* *** $p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/Nep1B* vs *Gal80^{ts};c739/+* *** $p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/Nep1B* vs */Nep1B* *** $p < 0.001$). In contrast, noninduced flies show similar LTM scores to the genetic controls ($F_{(4,40)} = 1.399, p = 0.2539, n \geq 8$). **F,** Nep2, Nep3, and Nep4 inhibition in adult α/β neurons does not alter LTM (Nep2A: $F_{(2,29)} = 0.06101, p = 0.9409, n = 10$; Nep3A: $F_{(2,50)} = 2.183, p = 0.1237, n \geq 10$; Nep4A: $F_{(2,50)} = 1.380, p = 0.2615, n \geq 11$). **G,** LTM analyses of double and triple Nep knock-down in adult α/β neurons. Nep2 + Nep3, Nep3 + Nep4, and Nep2 + Nep3 + Nep4 knock-down alter LTM (Nep2A/Nep3A: $F_{(2,43)} = 5.785, p = 0.0061, n \geq 14$; post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};c739/Nep2A/Nep3A* vs */Nep2A/Nep3A* * $p < 0.05$; Nep3A/Nep4A: $F_{(2,44)} = 5.876, p = 0.0056, n = 15$; post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};c739/Nep3A/Nep4A* vs *Gal80^{ts};c739/+* *** $p < 0.01$, *Gal80^{ts};c739/Nep3A/Nep4A* vs */Nep3A/Nep4A* * $p < 0.05$; Nep2A/Nep3A/Nep4A: $F_{(2,38)} = 3.986, p = 0.0273, n \geq 12$; post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};c739/Nep2A/Nep3A/Nep4A* vs *Gal80^{ts};c739/+* * $p < 0.05$, *Gal80^{ts};c739/Nep2A/Nep3A/Nep4A* vs */Nep2A/Nep3A/Nep4A* * $p < 0.05$), whereas Nep2 + Nep4 double knock-down does not ($F_{(2,38)} = 0.1079, p = 0.8980, n = 13$). **H,** In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(2,42)} = 0.2195, p = 0.8039, n \geq 14$).

led to a reduced expression of its targeted gene by 75% (Nep1), 50% (Nep2), 30% (Nep3), and 25% (Nep4) compared with the *elav/+* control (Fig. 1A). These data thus establish that the distinct RNAi constructs efficiently target each distinct neprilysin mRNA.

Preliminary experiments using the ubiquitous daughterless-Gal4 driver suggested that the expression of each of the four

neprilysins is required for MTM (data not shown). Because MTM has been shown to involve the α/β MB neurons (Bouzaiane et al., 2015), we further analyzed memory using the *c739* driver known to label α/β neurons specifically (Yang et al., 1995). To restrict RNAi-Nep expression to adulthood, we took advantage of the TARGET system (McGuire et al., 2003), which relies on a con-

ventional GAL4 activation system and a temperature-sensitive Gal80 inhibitor (Gal80^{ts}). Gal80^{ts} represses Gal4 transcriptional activity at low temperature (18°C), but this inhibition is lifted at high temperature (30°C). Experiments were performed with a *tub-Gal80^{ts};c739* line (Gal80^{ts};c739). Flies expressing RNAi-Nep1A (VDRC 27537) (Gal80^{ts};c739/Nep1A) showed an MTM deficit (Fig. 1B). To further establish the role of Nep1 in MTM formation, we needed to use a second nonoverlapping RNAi construct: RNAi-Nep1B (VDRC 108860). Because the RNAi-Nep1B line was not able to reduce Nep1 expression as efficiently as RNAi-Nep1A, we took advantage of the UAS-Dicer2 tool. Dicer is an RNase enzyme that facilitates the activation of the RNA-induced silencing complex essential for RNAi and Dicer2 overexpression in the fly has been shown to increase RNAi efficacy (Pham et al., 2004). We thus generated a line coexpressing RNAi-Nep1B and Dicer2 (Nep1B). Gal80^{ts};c739/Nep1B induced flies showed a strong MTM impairment (Fig. 1B), similar to that of Gal80^{ts};c739/Nep1A flies. In the absence of Gal4 induction, both Gal80^{ts};c739/Nep1A and Gal80^{ts};c739/Nep1B flies showed normal MTM scores (Fig. 1C), indicating that the deficit observed previously was specifically caused by Nep1 inhibition in the adult α/β neurons. We verified that the ability of induced Gal80^{ts};c739/Nep1A and Gal80^{ts};c739/Nep1B flies to avoid electric shocks and their olfactory acuity to each odor after electric shock exposure were unaffected (Table 1), thus showing that they displayed normal perception of the conditioning stimuli.

In contrast, reducing Nep2, Nep3, or Nep4 expression in adult α/β neurons did not affect MTM (Fig. 1D), suggesting that Nep2,

Table 2. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing several RNAi-Nep in adult α/β neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
Gal80 ^{ts} ;c739/+	74.83 ± 4.529	57.72 ± 3.573	60.00 ± 3.085
Gal80 ^{ts} ;c739/Nep2A;Nep3A	67.25 ± 5.104	51.75 ± 8.370	56.88 ± 4.206
+ /Nep2A;Nep3A	68.67 ± 3.046	61.80 ± 5.144	53.38 ± 2.679
Gal80 ^{ts} ;c739/Nep3A;Nep4A	62.58 ± 6.239	51.56 ± 4.916	49.88 ± 5.920
+ /Nep3A;Nep4A	72.67 ± 4.926	56.36 ± 3.977	49.88 ± 3.193
Gal80 ^{ts} ;c739/Nep2A;Nep3A;Nep4A	65.75 ± 6.763	56.30 ± 6.013	51.75 ± 2.218
+ /Nep2A;Nep3A;Nep4A	73.00 ± 3.400	40.86 ± 6.636	53.25 ± 3.863

Data are shown as means ± SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(6,83)} = 0.7803$, $p = 0.5879$, $n = 12$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(6,93)} = 1.445$, $p = 0.2067$, $n \geq 10$) and methylcyclohexanol ($F_{(6,59)} = 1.149$, $p = 0.3476$, $n \geq 8$) is impaired in flies expressing RNAi Nep2A + Nep3A, Nep3A + Nep4A or Nep2A + Nep3A + Nep4A under the control of the Gal80^{ts};c739 driver.

Nep3, and Nep4 expression in these neurons is not required for MTM. We next analyzed whether the lack of a MTM phenotype could be due to functional redundancy between these three neprilysins. For this purpose, we constructed flies carrying each possible double RNAi combination and the triple one. No combination of RNAi expression in the α/β neurons affected MTM (Fig. 1E). These data suggest that only Nep1 expression in the MB is required for MTM formation.

We then studied the other memory phases described in the fly. To assess learning, flies were tested immediately after a single cycle of training. Because it was shown that learning relies on α/β and also γ neurons (Bouzaiane et al., 2015), we used a *tub-*

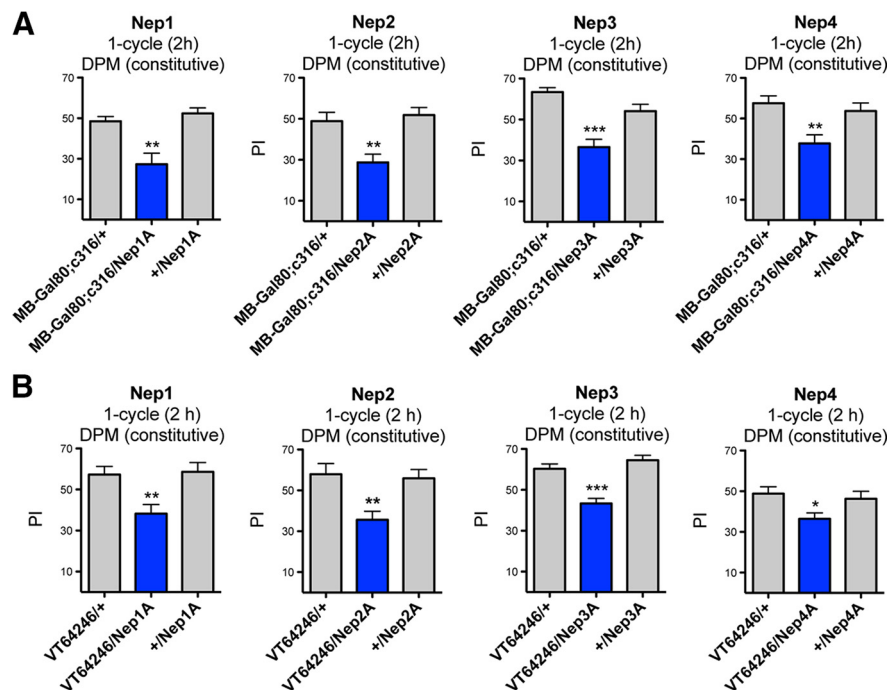


Figure 3. Constitutive inhibition of neprilysin expression in DPM neurons induces MTM deficits. **A**, Flies expressing RNAi-Nep under the control of the constitutive MB-Gal80;c316 driver exhibit significantly lower MTM scores than the genetic controls (Nep1A: $F_{(2,31)} = 11.73$, $p = 0.0002$, $n \geq 8$, post hoc Newman–Keuls test, MB-Gal80;c316/Nep1A vs MB-Gal80;c316/+ $***p < 0.01$, MB-Gal80;c316/Nep1A vs +/Nep1A $***p < 0.001$; Nep2A: $F_{(2,31)} = 10.72$, $p = 0.0003$, $n \geq 8$, post hoc Newman–Keuls test, MB-Gal80;c316/Nep2A vs MB-Gal80;c316/+ $***p < 0.01$, MB-Gal80;c316/Nep2A vs +/Nep2A $***p < 0.001$; Nep3A: $F_{(2,47)} = 18.58$, $p < 0.0001$, $n = 16$, post hoc Newman–Keuls test, MB-Gal80;c316/Nep3A vs MB-Gal80;c316/+ $***p < 0.001$, MB-Gal80;c316/Nep3A vs +/Nep3A $***p < 0.001$; Nep4A: $F_{(2,46)} = 6.939$, $p = 0.0024$, $n \geq 15$, post hoc Newman–Keuls test, MB-Gal80;c316/Nep4A vs MB-Gal80;c316/+ $***p < 0.01$, MB-Gal80;c316/Nep4A vs +/Nep4A $***p < 0.01$). **B**, Neprilysin inhibition in DPM neurons impairs MTM. VT64246/Nep1A, /Nep2A, /Nep3A, and /Nep4A flies exhibit MTM deficits compared with the genetic controls (Nep1A: $F_{(2,30)} = 7.403$, $p = 0.0026$, $n \geq 9$, post hoc Newman–Keuls test, VT64246/Nep1A vs VT64246/+ $***p < 0.01$, VT64246/Nep1A vs +/Nep1A $***p < 0.01$; Nep2A: $F_{(2,29)} = 7.942$, $p = 0.0019$, $n \geq 8$, post hoc Newman–Keuls test, VT64246/Nep2A vs VT64246/+ $***p < 0.01$, VT64246/Nep2A vs +/Nep2A $***p < 0.01$; Nep3A: $F_{(2,41)} = 21.33$, $p < 0.0001$, $n = 14$, post hoc Newman–Keuls test, VT64246/Nep3A vs VT64246/+ $***p < 0.001$, VT64246/Nep3A vs +/Nep3A $***p < 0.001$; Nep4A: $F_{(2,49)} = 3.872$, $p = 0.0278$, $n \geq 16$, post hoc Newman–Keuls test, VT64246/Nep4A vs VT64246/+ $*p < 0.05$, VT64246/Nep4A vs +/Nep4A $*p < 0.05$).

Gal80^{ts};238Y driver to achieve inhibition in all MB neuronal types (Aso et al., 2009). Induced *Gal80^{ts};238Y/Nep1A* and *Gal80^{ts};238Y/Nep1B* flies displayed normal learning (Fig. 2A). We next assessed the effect of Nep2, Nep3, and Nep4 silencing on learning. The data show that the triple silencing did not affect learning (Fig. 2B). Together, the data suggest that no neprilysin is required in the MB for learning.

To analyze ARM formation, memory was tested 24 h after a massed conditioning. Induced *Gal80^{ts};238Y/Nep1A* and *Gal80^{ts};238Y/Nep1B* flies displayed normal ARM (Fig. 2C). *Gal80^{ts};238Y/Nep2A;Nep3A,Nep4A* induced flies also showed normal ARM scores (Fig. 2D). The data suggest that the neprilysins' expression in the MB is not involved in ARM formation.

To study the potential involvement of neprilysins in LTM, memory tests were performed 24 h after a spaced conditioning. We analyzed LTM of flies expressing RNAi-Nep1 in α/β neurons, the MB neurons required for this process (Bouzaiane et al., 2015). After induction, *Gal80^{ts};c739/Nep1A* and *Gal80^{ts};c739/Nep1B* flies displayed LTM scores significantly lower than their genetic controls (Fig. 2E). In the absence of Gal4 induction, flies performed normally (Fig. 2E), showing that Nep1 expression in α/β neurons is involved in LTM.

Even though Nep2, Nep3, and Nep4 expression did not seem to be required in the MB for MTM, we assessed whether they were required in the MB for LTM. *Gal80^{ts};c739/Nep2A, /Nep3A* and */Nep4A* induced flies displayed similar LTM scores to the genetic controls (Fig. 2F). To further address the potential role of these neprilysins in the MB for LTM formation, we analyzed double and triple combination of Nep inhibition. Whereas Nep2 + Nep4 inhibition did not affect LTM, combined inhibition of Nep2 + Nep3 and Nep3 + Nep4 led to altered LTM (Fig. 2G). As expected, the triple Nep2 + Nep3 + Nep4 silencing also led to LTM impairment (Fig. 2G). In the absence of induction, all genotypes displayed normal LTM scores (Fig. 2H). Finally, we verified that these flies perceived normally the stimuli used for conditioning (Table 2). In conclusion, the expression of all four neprilysins is required in the adult MB for LTM processes.

All four neprilysins are required in DPM neurons for MTM

To further study in which brain structure Nep2, Nep3, and Nep4 are involved in MTM, we next used the *MB247-Gal80;c316* driver (*MB-Gal80;c316*). *c316* is known to label intensively the DPM neurons, a pair of neurons required for aversive MTM (Waddell et al., 2000). The *MB-Gal80;c316* driver allows expression in all neurons expressing the *c316* Gal4 (Haynes et al., 2015) except in the MB neurons that express the Gal80 repressor specifically. Interestingly, the expression of any RNAi-Nep under the control of this driver (*MB-Gal80;c316/Nep*) led to significantly impaired MTM compared with the genetic controls (Fig. 3A). We next tested the sensory–motor capacities of the *MB-Gal80;c316/Nep* flies and found that they displayed wild-type shock reactivity and olfactory acuity (Table 3).

To verify that neprilysin expression is required in the DPM neurons for MTM, we used the *VT64246* Gal4 driver that labels DPM neurons specifically (Lee et al., 2011). The silencing of each neprilysin achieved with the *VT64246* driver led to significant MTM deficits (Fig. 3B). We conclude that the expression of all four neprilysins in DPM neurons is required for MTM formation.

We then sought to determine whether the MTM deficits shown by *VT64246/Nep* flies were due to developmental or acute effects. To achieve transient expression of Nep-RNAi, we generated an inducible *tub-Gal80^{ts};VT64246* Gal4-line (*Gal80^{ts};*

Table 3. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing RNAi-Nep(A) under the control of the *MB-Gal80;c316* driver

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>MB-Gal80;c316/+</i>	60.80 ± 3.405	60.63 ± 6.219	60.90 ± 6.667
<i>MB-Gal80;c316/Nep1A</i>	58.30 ± 1.808	67.10 ± 7.114	58.70 ± 5.173
<i>+ /Nep1A</i>	64.10 ± 4.927	62.10 ± 5.288	59.50 ± 5.300
<i>MB-Gal80;c316/+</i>	63.25 ± 4.366	52.36 ± 7.890	65.25 ± 7.345
<i>MB-Gal80;c316/Nep2A</i>	62.83 ± 3.946	47.17 ± 5.455	73.13 ± 4.155
<i>+ /Nep2A</i>	77.67 ± 3.530	60.15 ± 4.650	69.13 ± 8.532
<i>MB-Gal80;c316/+</i>	58.43 ± 5.149	49.00 ± 4.472	54.56 ± 3.986
<i>MB-Gal80;c316/Nep3A</i>	52.50 ± 4.056	54.75 ± 6.648	53.42 ± 4.763
<i>+ /Nep3A</i>	73.70 ± 4.261	51.17 ± 6.457	54.33 ± 3.945
<i>MB-Gal80;c316/+</i>	58.57 ± 4.961	52.33 ± 4.330	58.56 ± 4.628
<i>MB-Gal80;c316/Nep4A</i>	56.90 ± 8.849	52.00 ± 4.424	62.00 ± 4.149
<i>+ /Nep4A</i>	58.30 ± 5.863	53.08 ± 5.016	52.08 ± 3.718

Data are shown as means ± SEM. All genotypes tested exhibit normal shock reactivity (Nep1A: $F_{(2,29)} = 0.6487$, $p = 0.5307$, $n = 10$; Nep2A: $F_{(2,35)} = 4.544$, $p = 0.0181$, $n = 12$, post-hoc Newman–Keuls test, *MB-Gal80;c316/Nep2A* vs *+ /Nep2A* $p < 0.05$; Nep3A: $F_{(2,26)} = 6.699$, $p = 0.0049$, $n \geq 7$, post hoc Newman–Keuls test, *MB-Gal80;c316/Nep3A* vs *+ /Nep3A* $p < 0.01$; Nep4A: $F_{(2,26)} = 0.01578$, $p = 0.9844$, $n \geq 7$) and normal olfactory acuity for octanol (Nep1A: $F_{(2,27)} = 0.2913$, $p = 0.7498$, $n \geq 8$; Nep2A: $F_{(2,35)} = 1.249$, $p = 0.3000$, $n \geq 11$; Nep3A: $F_{(2,32)} = 0.2108$, $p = 0.8111$, $n \geq 9$; Nep4A: $F_{(2,32)} = 0.01515$, $p = 0.9850$, $n \geq 9$) and methylcyclohexanol (Nep1A: $F_{(2,29)} = 0.03746$, $p = 0.9633$, $n = 10$; Nep2A: $F_{(2,23)} = 0.3230$, $p = 0.7275$, $n = 8$; Nep3A: $F_{(2,32)} = 0.01955$, $p = 0.9807$, $n \geq 9$; Nep4A: $F_{(2,32)} = 1.609$, $p = 0.2168$, $n \geq 9$).

VT64246). The expression of each RNAi-Nep tested led to significant MTM deficits (Fig. 4A). These deficits were not observed when flies were incubated under nonpermissive temperature (Fig. 4B), which shows that the deficits were caused specifically by RNAi induction in adult DPM neurons. We further verified that *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A, /Nep2A, /Nep3A*, and */Nep4A* flies were able to perceive the conditioning stimuli normally. All of the genotypes tested showed normal shock reactivity and normal olfactory acuity to each odor after electric shock exposure (Table 4).

The RNAi constructs used in this study did not show any predicted off-target regions (Vienna *Drosophila* Resource Center and dscheck.rnai.jp). However, to strengthen our data, we used another nonoverlapping RNAi sequence for each neprilysin. As we did for Nep1B, we constructed lines encoding RNAi-Nep2B, 3B, or 4B construct and Dicer2 (Nep2B, Nep3B, and Nep4B). When expressed for 3 d under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver, these constructs led to significant MTM deficits (Fig. 4C) that were not apparent when flies were incubated at nonpermissive temperature (Fig. 4D), thus showing that they were caused specifically by RNAi induction in adult DPM neurons. We verified that *Gal80^{ts};VT64246/Nep1B, /Nep2B, /Nep3B, /Nep4B* flies displayed normal shock sensitivity and olfactory acuity (Table 4). Together, the data establish that all four neprilysins are required in adult DPM neurons for MTM.

Nep1, Nep3, and Nep4 are required in adult DPM neurons for LTM

To further characterize neprilysin function in DPM neurons we then studied the other memory phases. We first analyzed the effect of neprilysin silencing in adult DPM neurons on learning. After 3 d of induction, all genotypes tested displayed normal learning (Fig. 5A), showing that inhibiting the expression of any neprilysin in adult DPM neurons does not disrupt this process. Because we observed functional redundancy in the MB among Nep2, Nep3, and Nep4, we also analyzed triple silencing in adult DPM neurons. *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A;Nep3A;Nep4A* flies exhibited wild-type learning scores (Fig. 5B). We then assessed ARM formation. After induction, *Gal80^{ts};VT64246/Nep* flies ex-

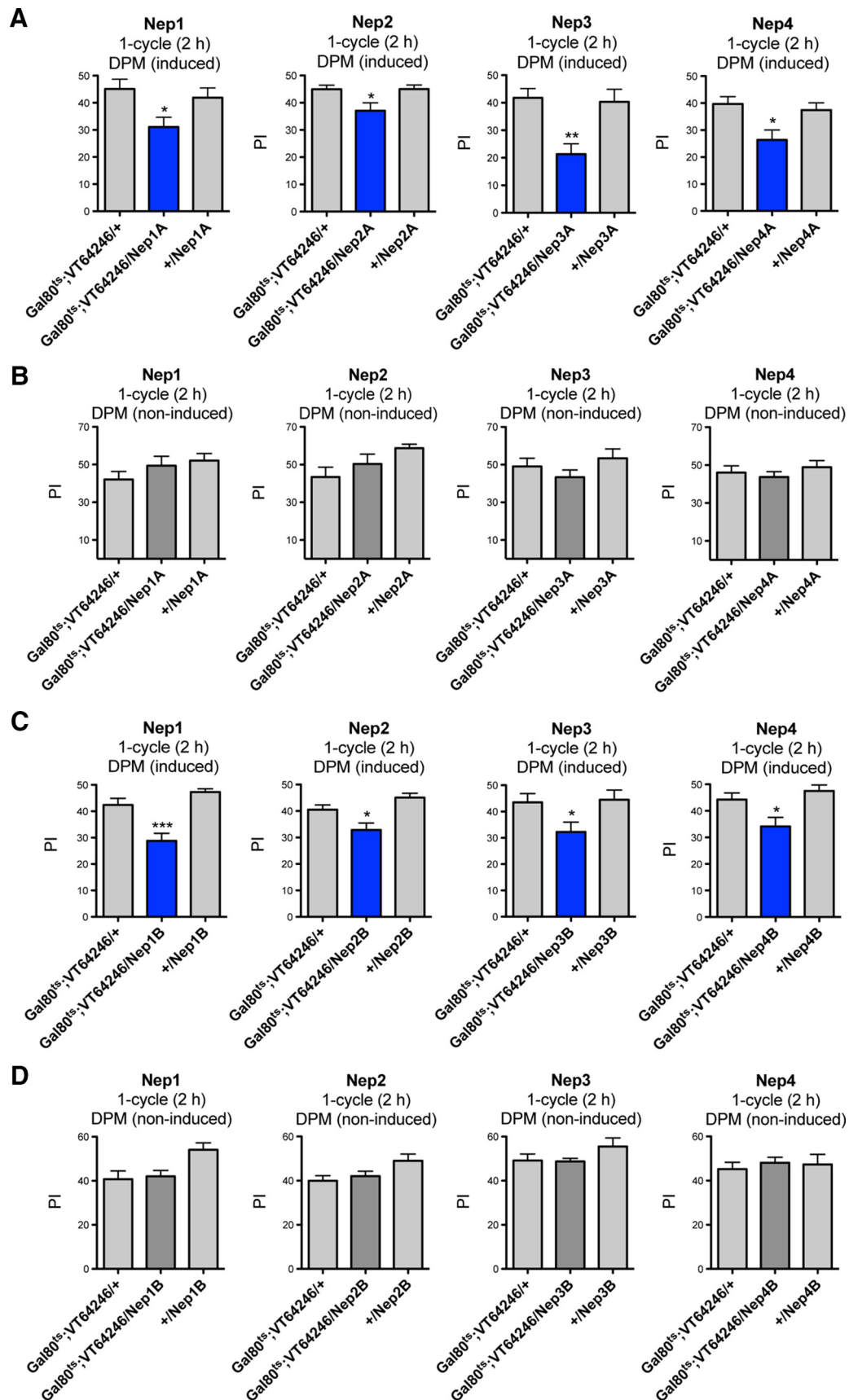


Figure 4. Neprilysin inhibition in adult DPM neurons induces MTM deficits. **A, B**, MTM analyses of flies expressing RNAi-Nep(A) in adult DPM neurons. **A**, After 3 d of induction, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep2A*, */Nep3A* and */Nep4A* flies exhibit MTM deficits compared with the genetic controls (Nep1A: $F_{(2,73)} = 4.125$, $p = 0.0202$, $n \geq 23$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* * $p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* vs *+/Nep1A* * $p < 0.05$; Nep2A: $F_{(2,34)} = 4.729$, $p = 0.0159$, $n \geq 11$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* * $p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* vs *+/Nep2A* * $p < 0.05$; Nep3A: $F_{(2,28)} = 8.327$, $p = 0.0016$, $n \geq 9$, post hoc Newman–Keuls test (Figure legend continues.)

Table 4. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing RNAi-Nep under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	63.43 ± 6.651	55.27 ± 5.051	44.50 ± 6.379
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep1A</i>	71.13 ± 4.315	49.91 ± 6.962	45.88 ± 6.396
<i>+ /Nep1A</i>	71.38 ± 8.527	50.10 ± 6.622	42.75 ± 13.55
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	69.83 ± 6.705	55.88 ± 9.542	49.30 ± 9.745
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep2A</i>	72.63 ± 5.628	50.10 ± 8.214	56.50 ± 6.668
<i>+ /Nep2A</i>	62.75 ± 7.250	61.50 ± 6.841	53.63 ± 4.594
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	57.50 ± 6.059	55.25 ± 7.695	61.58 ± 6.389
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep3A</i>	62.88 ± 3.512	53.30 ± 9.300	56.11 ± 7.162
<i>+ /Nep3A</i>	66.25 ± 6.922	70.90 ± 5.921	58.89 ± 10.88
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	68.17 ± 8.392	66.80 ± 4.098	57.27 ± 3.996
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep4A</i>	79.88 ± 4.510	64.60 ± 4.815	51.00 ± 3.827
<i>+ /Nep4A</i>	77.75 ± 5.778	55.60 ± 7.365	48.78 ± 3.403
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	60.30 ± 4.652	57.00 ± 4.110	46.40 ± 5.594
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep1B</i>	67.30 ± 3.718	49.30 ± 4.258	53.20 ± 5.884
<i>+ /Nep1B</i>	66.90 ± 5.992	53.30 ± 4.507	48.10 ± 5.176
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	65.38 ± 3.891	50.56 ± 4.998	43.00 ± 3.990
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep2B</i>	63.60 ± 4.710	50.71 ± 3.640	45.00 ± 2.736
<i>+ /Nep2B</i>	75.90 ± 4.067	47.36 ± 3.832	46.93 ± 3.311
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	82.08 ± 3.773	54.63 ± 7.620	46.33 ± 6.954
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep3B</i>	76.60 ± 2.831	62.67 ± 7.754	53.83 ± 7.483
<i>+ /Nep3B</i>	77.93 ± 2.861	54.17 ± 7.213	47.33 ± 6.740
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	79.88 ± 3.618	61.56 ± 5.984	40.11 ± 3.318
<i>Gal80^{ts};VT64246/Nep4B</i>	70.70 ± 4.407	51.93 ± 4.673	42.86 ± 2.526
<i>+ /Nep4B</i>	75.50 ± 4.086	52.36 ± 4.691	47.64 ± 4.437

Data are shown as means ± SEM. After 3 d of induction, flies show normal shock reactivity (Nep1A: $F_{(2,22)} = 0.4276$, $p = 0.6579$, $n \geq 7$; Nep2A: $F_{(2,21)} = 0.6423$, $p = 0.5371$, $n \geq 6$; Nep3A: $F_{(2,21)} = 0.5587$, $p = 0.5811$, $n \geq 6$; Nep4A: $F_{(2,21)} = 0.9509$, $p = 0.4040$, $n \geq 6$; Nep1B: $F_{(2,29)} = 0.6496$, $p = 0.5302$, $n = 10$; Nep2B: $F_{(2,27)} = 2.498$, $p = 0.1026$, $n \geq 8$; Nep3B: $F_{(2,41)} = 0.7835$, $p = 0.4639$, $n \geq 12$; Nep4B: $F_{(2,27)} = 1.185$, $p = 0.3225$, $n \geq 8$) and normal olfactory acuity for octanol (Nep1A: $F_{(2,31)} = 0.2410$, $p = 0.7874$, $n \geq 10$; Nep2A: $F_{(2,27)} = 0.5280$, $p = 0.5962$, $n \geq 8$; Nep3A: $F_{(2,27)} = 1.593$, $p = 0.2232$, $n \geq 8$; Nep4A: $F_{(2,29)} = 1.121$, $p = 0.3406$, $n = 10$; Nep1B: $F_{(2,29)} = 0.8040$, $p = 0.4580$, $n = 10$; Nep2B: $F_{(2,36)} = 0.2337$, $p = 0.7928$, $n \geq 9$; Nep3B: $F_{(2,31)} = 0.4174$, $p = 0.6627$, $n \geq 8$; Nep4B: $F_{(2,36)} = 0.9737$, $p = 0.3880$, $n \geq 9$) and methylcyclohexanol (Nep1A: $F_{(2,27)} = 0.02737$, $p = 0.9730$, $n \geq 8$; Nep2A: $F_{(2,25)} = 0.2235$, $p = 0.8015$, $n \geq 8$; Nep3A: $F_{(2,29)} = 0.1186$, $p = 0.8886$, $n \geq 9$; Nep4A: $F_{(2,29)} = 1.372$, $p = 0.2706$, $n \geq 9$; Nep1B: $F_{(2,29)} = 0.4053$, $p = 0.6708$, $n = 10$; Nep2B: $F_{(2,36)} = 0.3242$, $p = 0.7253$, $n \geq 9$; Nep3B: $F_{(2,35)} = 0.3322$, $p = 0.7197$, $n = 12$; Nep4B: $F_{(2,36)} = 1.044$, $p = 0.3630$, $n \geq 9$).

←

(Figure legend continued.) test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3A* vs *+ /Nep3A* $**p < 0.01$; Nep4A: $F_{(2,73)} = 5.493$, $p = 0.0061$, $n \geq 24$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4A* vs *+ /Nep4A* $*p < 0.05$). **B**, Noninduced flies show similar MTM scores to the genetic controls (Nep1A: $F_{(2,26)} = 1.300$, $p = 0.2910$, $n \geq 8$; Nep2A: $F_{(2,26)} = 2.942$, $p = 0.0720$, $n \geq 7$; Nep3A: $F_{(2,35)} = 1.323$, $p = 0.2801$, $n = 12$; Nep4A: $F_{(2,58)} = 0.5983$, $p = 0.5532$, $n \geq 19$). **C**, **D**, MTM analyses of flies expressing RNAi-Nep(B) in adult DPM neurons. **C**, After 3 d of induction, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1B*, */Nep2B*, */Nep3B* and */Nep4B* flies exhibit significantly lower MTM scores than the genetic controls (Nep1B: $F_{(2,41)} = 17.03$, $p < 0.0001$, $n = 14$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1B* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $***p < 0.001$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1B* vs *+ /Nep1B* $***p < 0.001$; Nep2B: $F_{(2,39)} = 9.124$, $p = 0.0006$, $n \geq 12$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2B* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $*p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2B* vs *+ /Nep2B* $***p < 0.001$; Nep3B: $F_{(2,44)} = 3.669$, $p = 0.0340$, $n \geq 13$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3B* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $*p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3B* vs *+ /Nep3B* $*p < 0.05$; Nep4B: $F_{(2,53)} = 6.527$, $p = 0.0030$, $n \geq 15$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4B* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $*p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4B* vs *+ /Nep4B* $**p < 0.01$). **D**, Noninduced flies show normal MTM scores (Nep1B: $F_{(2,30)} = 5.178$, $p = 0.0122$, $n \geq 10$, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1B* vs *+ /Nep1B* $*p < 0.05$; Nep2B: $F_{(2,33)} = 3.422$, $p = 0.0454$, $n \geq 10$; Nep3B: $F_{(2,32)} = 1.703$, $p = 0.1993$, $n = 11$; Nep4B: $F_{(2,33)} = 0.1703$, $p = 0.8442$, $n \geq 10$).

hibited wild-type ARM scores (Fig. 5C). Similar results were observed with Nep2 + Nep3 + Nep4 silencing in adult DPM neurons (Fig. 5D). Together, the data suggest that neprilysin expression in adult DPM neurons is not required for normal aversive learning and ARM.

We next analyzed the effect of neprilysin silencing in adult DPM neurons on LTM. After induction at 30°C, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep3A*, and */Nep4A* flies showed significantly lower LTM scores than their genetic controls (Fig. 5E). These LTM deficits were specific to RNAi-Nep induction in adult DPM neurons because *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep* flies incubated at 18°C showed wild-type LTM (Fig. 5F). Therefore, Nep1, Nep3, and Nep4 are each involved in LTM formation in DPM neurons. In contrast, Nep2 inhibition in adult DPM neurons (*Gal80^{ts};VT64246/Nep2A*) did not alter memory scores measured 24 h after spaced conditioning (Fig. 5G). To validate that the memory formed in this case was indeed LTM, we ran CXM treatments. It has been shown that LTM formation is specifically sensitive to CXM because it is the only memory phase dependent on *de novo* protein synthesis (Tully et al., 1994). As expected, when wild-type (+) and *Gal80^{ts};VT64246/+* control flies were fed with CXM, LTM scores decreased significantly (Fig. 5H). *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* flies fed with CXM exhibited significantly lower memory scores compared with same-genotype flies not fed CXM and similar scores to control flies (Fig. 5H). The data thus demonstrate that inhibition of Nep2 expression in adult DPM neurons does not alter LTM. Together, the results show that Nep1, Nep3, and Nep4 expression are required in adult DPM neurons for LTM formation.

Discussion

Research on neprilysins has essentially focused on their role as the main Aβ-degrading enzymes in pathological situations and as biomarkers in heart failure. Here, using *Drosophila*, we established that neprilysins are involved in specific types of memory. Disrupting the expression of any neprilysin impairs MTM and LTM, revealing that one or several neuropeptides need to be targeted to enable proper memory formation. Interestingly, all four neprilysins expressed in the fly are required in the MB and also in DPM neurons, a pair of large neurons that broadly innervates the MB and are involved in memory consolidation.

Neprilysins have been described extensively as proteases acting on substrates of no more than 50 residues (Oefner et al., 2000), except *Drosophila* Nep4, which is involved in muscle integrity independently of its catalytic activity (Panz et al., 2012). There is a consensus that neprilysins function by turning off neuropeptide signals at the synapse (Turner, 2003). In addition, there is evidence to suggest that neprilysin processing could lead to the activation of neuromodulators (Gourlet et al., 1997; Rose et al., 2009). Therefore, in addition to their role in Aβ degradation, neprilysins also inactivate a large number of peptides and are thus equally involved in a large number of processes.

In *Drosophila*, several small peptides have been linked to olfactory memory. Short neuropeptide F (sNPF) is highly expressed in the MB and has been described as a functional neuromodulator of appetitive memory (Knapek et al., 2013). *Drosophila* neuropeptide F (dNPF) has been shown to provide a motivational switch in the MB that controls appetitive memory output (Krashes et al., 2009). Interestingly, dNPF is an ortholog of mammalian NPY (Brown et al., 1999), a peptide identified as an hNEP substrate (Rose et al., 2009). hNEP can process NPY in transgenic mice to produce neuroactive fragments. Because components of dNPF/NPY signaling are conserved at both the functional and molecular levels, it is possible that dNPF is

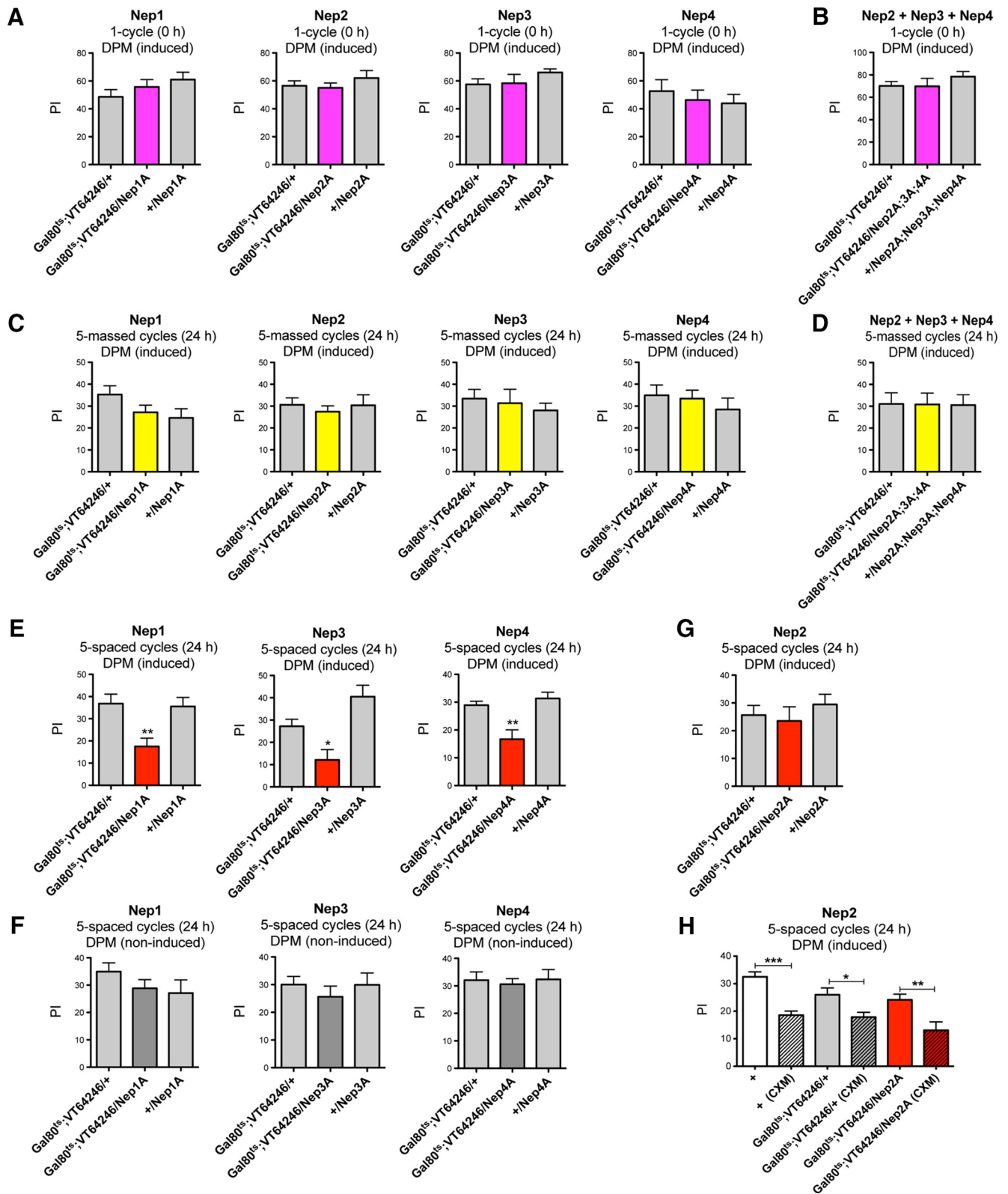


Figure 5. Nep1, Nep3 and Nep4 are required in adult DPM neurons for LTM. **A, B**, Neprilysin silencing in adult DPM neurons does not alter learning. **A**, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep2A*, */Nep3A* and */Nep4A* flies display similar learning scores to controls (*Nep1A*: $F_{(2,24)} = 1.296$, $p = 0.2936$, $n \geq 7$; *Nep2A*: $F_{(2,29)} = 0.7634$, $p = 0.4759$, $n = 10$; *Nep3A*: $F_{(2,21)} = 1.057$, $p = 0.3671$, $n \geq 6$; *Nep4A*: $F_{(2,26)} = 0.3883$, $p = 0.6824$, $n = 9$). **B**, Concomitant silencing of Nep2, Nep3, and Nep4 does not affect learning. *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A;Nep3A;Nep4A* flies exhibit similar learning scores to the genetic controls ($F_{(2,25)} = 0.8933$, $p = 0.423$, $n \geq 8$). **C, D**, Neprilysin silencing in adult DPM neurons does not alter ARM. **C**, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep2A*, */Nep3A*, and */Nep4A* flies display similar memory scores to controls (*Nep1A*: $F_{(2,36)} = 2.079$, $p = 0.1407$, $n \geq 12$; *Nep2A*: $F_{(2,37)} = 0.2217$, $p = 0.8022$, $n \geq 10$; *Nep3A*: $F_{(2,31)} = 0.3567$, $p = 0.7030$, $n \geq 10$; *Nep4A*: $F_{(2,34)} = 0.5298$, $p = 0.5938$, $n \geq 11$). **D**, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A;Nep3A;Nep4A* flies exhibit normal ARM scores ($F_{(2,39)} = 0.0344$, $p = 0.9966$, $n \geq 13$). **E–H**, Nep1, Nep3, and Nep4 are required in DPM neurons for LTM. **E**, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep3A* and */Nep4A* flies show LTM deficits (*Nep1A*: $F_{(2,37)} = 7.369$, $p = 0.0021$, $n \geq 10$, *post hoc* Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* vs *+/Nep1A* $**p < 0.01$; *Nep3A*: $F_{(2,45)} = 10.49$, $p = 0.0002$, $n \geq 15$, *post hoc* (Figure legend continues.)

targeted by neprilysins. It remains to be determined whether such peptides are involved in aversive memory and, conversely, whether neprilysins are involved in appetitive memory.

Although all four *Drosophila* neprilysins are involved in identical memory phases, they exhibit distinct features in terms of the neuronal circuits involved. Only Nep1 inhibition in α/β MB and DPM neurons alters both MTM and LTM. One hypothesis is that Nep1 expressed in DPM and MB neurons plays the same role, targeting a single substrate at synapses connecting the two structures. If so, the lifetime of such a substrate would need to be restricted strictly to limit its effect.

Like the other neprilysins, Nep2 is involved in MTM and LTM, but it exhibits a peculiar characteristic: Nep2 inhibition in DPM neurons leads to MTM disruption, whereas it does not alter LTM. Although we cannot rule out that Nep2 expression in DPM neurons is required for LTM, but that its silencing does not reach a level critical for this process, the data suggest that Nep2 expression in DPM neurons is not required for LTM formation. It is noteworthy that neprilysins are synthesized as type II integral membrane proteins (Turner et al., 2001), whereas Nep2 is a soluble secreted endopeptidase (Thomas et al., 2005; Bland et al., 2007). Whether an endopeptidase is tethered or fully secreted will have important implications in terms of field of activity and enzyme concentration at the membrane surface. It is possible that Nep2 secreted from either DPM neurons or another structure in the vicinity, such as MB neurons, is able to play an identical role. Therefore, Nep2 reduction in either neuronal structure would not be sufficient to affect LTM. In contrast, Nep2 expression in such a structure would not be able to compensate Nep2 silencing in DPM neurons for MTM, pointing to a distinct requirement for MTM and LTM formation. Nep2 might be required at a distinct concentration and/or localization for MTM and LTM or it may target distinct substrates for these two processes.

The data reveal functional redundancy among Nep2, Nep3, and Nep4 for LTM formation in the α/β neurons. Namely, concomitant silencing of Nep2 + Nep3 or Nep3 + Nep4 leads to altered LTM. It is possible that several neprilysins target a single neuropeptide. However, because concomitant silencing of Nep2 + Nep4 does not affect LTM, it seems more likely that several targets are involved in LTM.

The memory phenotypes observed after each neprilysin reduction are reminiscent of the pattern in APPL mutants. Indeed, we showed previously that expression of APPL, the APP fly ortholog, is required in the MB for MTM and LTM formation, but not for learning and ARM (Goguel et al., 2011; Bourdet et al.,

2015). An attractive hypothesis is that A β peptide derived from physiological processing of APPL might play a role in memory and act as a substrate for one of the neprilysin peptidases. Nep2 would be a good candidate because several studies have shown that it is capable of degrading human A β (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008). Supporting this hypothesis, several reports in mammals have implicated low physiological concentrations of A β peptide in memory formation (Puzzo et al., 2008; Garcia-Osta and Alberini, 2009; Morley et al., 2010).

The memory phenotypes observed here are equally reminiscent of the pattern displayed by *amnesiac* (*amn*) mutants (Quinn et al., 1979; Feany and Quinn, 1995; DeZazzo et al., 1999; Yu et al., 2006). The *amn* gene isolated through behavioral screening for memory mutants (Quinn et al., 1979) was later shown to encode a predicted neuropeptide precursor (Feany and Quinn, 1995). Although the mature products of the *amn* gene have not been identified, sequence analyses suggested the existence of three potential peptides. One of them is homologous to mammalian pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a neuromodulator and neurotransmitter that regulates a variety of physiological processes through stimulation of cAMP production (Miyata et al., 1989; for review, see Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000). *In vitro* studies have shown that hNEP can degrade PACAP (Gourlet et al., 1997) and the analysis of the biological properties of the resulting fragments found that PACAP degradation by hNEP produces active metabolites selective for a particular receptor subtype. One of the major sites of PACAP cleavage by hNEP is conserved in the AMN peptide. It was shown that AMN is highly expressed in DPM neurons, where the four neprilysins are required for MTM (Waddell et al., 2000). DPM output is required during the consolidation phase for MTM and it was suggested that DPM might release the AMN modulatory neuropeptide that alters the physiology of MB neurons to help stabilize or consolidate odor memories (Keene et al., 2004). The fact that neuropeptides are often coreleased with classical neurotransmitters, but generally have slower and longer-lasting postsynaptic effects, has prompted the hypothesis that AMN peptides may be released at the MB to produce relatively long-lasting, physiological changes. Given this context, it is tempting to speculate that AMN might be one of the *Drosophila* neprilysin's targets.

Both the axons and dendrites of DPM are evenly distributed in different lobes of the MB, and it has been suggested that DPM neurons are presynaptic and postsynaptic to the MB neurons and are recurrent feedback neurons (Yu et al., 2005; Keene et al., 2006; Wu et al., 2013; review, Perisse et al., 2013). Because neprilysins are necessary in the DPM, and also in the α/β neurons of the MB where MTM and LTM are stored (Bouzaiane et al., 2015), these proteins could be involved in maintaining a loop between the DPM and MB lobes by restricting the lifetime of neuromodulators. The DPM- α/β neurons circuit has been shown recently to also modulate egg-laying decision via the AMN neuropeptide (Wu et al., 2015). It would be interesting to learn whether neprilysins are involved in this process or if their function is restricted to memory formation.

Despite the importance of the MB for olfactory memory, a functional neurotransmitter or coreleased peptidic neuromodulators produced by MB-intrinsic cells has long remained elusive. It was shown recently that acetylcholine is a Kenyon cell transmitter (Barnstedt et al., 2016). The fact that several neprilysins are required for MTM and LTM suggests the involvement of at least one neuropeptide. It remains to be determined whether neprilysin targets are released from the DPM and/or MB and whether identical or distinct neuropeptide substrates support MTM and

←

(Figure legend continued.) Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* **p* < 0.05, *Gal80^{ts};VT64246/Nep3A* vs +/*Nep3A* ****p* < 0.001; *Nep4A*: *F*_(2,38) = 10.08, *p* = 0.0003, *n* = 13, post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* ***p* < 0.01, *Gal80^{ts};VT64246/Nep4A* vs +/*Nep4A* ****p* < 0.001). **F**, In the absence of induction, *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A*, */Nep3A* and */Nep4A* flies display similar LTM scores to the genetic controls (*Nep1A*: *F*_(2,67) = 1.316, *p* = 0.2752, *n* ≥ 20; *Nep3A*: *F*_(2,53) = 0.4687, *p* = 0.6285, *n* ≥ 17; *Nep4A*: *F*_(2,39) = 0.1010, *p* = 0.9042, *n* ≥ 13). **G, H**, Nep2 silencing in DPM neurons does not impact LTM. **G**, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* flies exhibit similar LTM scores to controls (*Nep2A*: *F*_(2,47) = 0.5551, *p* = 0.5779, *n* ≥ 15). **H**, Memory formed after 5 spaced training cycles by *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A*-induced flies is LTM. Treatment with CXM (CXM) induces a memory decrease for all genotypes tested [*F*_(5,88) = 10.87, *p* < 0.0001, *n* ≥ 14; post hoc Newman–Keuls test, + vs + (CXM) ****p* < 0.001, *Gal80^{ts};VT64246/+* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* (CXM) **p* < 0.05, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* (CXM) ****p* < 0.01]. After CXM treatment, the remaining memory of *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* flies is similar to that of their genetic control group (post hoc Newman–Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* (CXM) vs *Gal80^{ts};VT64246/+* (CXM) *p* > 0.05).

LTM processes. The sum of the work reported here highlights the critical role of the DPM in inactivating and/or processing neuropeptides involved in memory processes connected to the MB.

References

- Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 48:301–331. [CrossRef Medline](#)
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172. [CrossRef Medline](#)
- Barnstedt O, Oswald D, Felsenberg J, Brain R, Moszynski JP, Talbot CB, Perrat PN, Waddell S (2016) Memory-relevant mushroom body output synapses are cholinergic. *Neuron* 89:1237–1247. [CrossRef Medline](#)
- Bland ND, Thomas JE, Audsley N, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE (2007) Expression of NEP2, a soluble neprilysin-like endopeptidase, during embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Peptides* 28:127–135. [CrossRef Medline](#)
- Bland ND, Pinney JW, Thomas JE, Turner AJ, Isaac RE (2008) Bioinformatic analysis of the neprilysin (M13) family of peptidases reveals complex evolutionary and functional relationships. *BMC Evol Biol* 8.
- Bourdet I, Pr  at T, Goguel V (2015) The full-length form of the *Drosophila* amyloid precursor protein is involved in memory formation. *J Neurosci* 35:1043–1051. [CrossRef Medline](#)
- Bouzaiane E, Trannoy S, Scheunemann L, Plaçais PY, Pr  at T (2015) Two independent mushroom body output circuits retrieve the six discrete components of *Drosophila* aversive memory. *Cell Rep* 11:1280–1292. [CrossRef Medline](#)
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415. [Medline](#)
- Brown MR, Crim JW, Arata RC, Cai HN, Chun C, Shen P (1999) Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides* 20:1035–1042. [CrossRef Medline](#)
- Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM (2005) Age- and region-dependent alterations in A  -degrading enzymes: implications for A  -induced disorders. *Neurobiol Aging* 26:645–654. [CrossRef Medline](#)
- Cao W, Song HJ, Gangi T, Kelkar A, Antani I, Garza D, Konsolaki M (2008) Identification of novel genes that modify phenotypes induced by Alzheimer's: amyloid overexpression in *Drosophila*. *Genetics* 178:1457–1471. [CrossRef Medline](#)
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JA (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet* 39:715–720. [CrossRef Medline](#)
- Crittenden JR, Skoulakis EMC, Han KA, Kalderon D, Davis RL (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem* 5:38–51. [Medline](#)
- de Belle JS, Heisenberg M (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263:692–695. [CrossRef Medline](#)
- DeZazzo J, Xia S, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999) Developmental expression of an *amn+* transgene rescues the mutant memory defect of *amnesiac* adults. *J Neurosci* 19:8740–8746. [Medline](#)
- Feany MB, Quinn WG (1995) A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Science* 268:869–873. [CrossRef Medline](#)
- Finelli A, Kelkar A, Song HJ, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's A  42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375. [CrossRef Medline](#)
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) A  -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A   pathology. *Neurosci Res* 43:39–56. [CrossRef Medline](#)
- Garcia-Osta A, Alberini CM (2009) Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* 16:267–272. [CrossRef Medline](#)
- Gerber B, Scherer S, Neuser K, Michels B, Hendel T, Stocker RF, Heisenberg M (2004) Visual learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *J Exp Biol* 207:179–188. [CrossRef Medline](#)
- Goguel V, Belair AL, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Pr  at T (2011) *Drosophila* amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *J Neurosci* 31:1032–1037. [CrossRef Medline](#)
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P, Deschodt-Lanckman M (1997) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.111. *Biochem Pharmacol* 54:509–515. [CrossRef Medline](#)
- Haynes PR, Christmann BL, Griffith LC (2015) A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 4. [CrossRef Medline](#)
- Heisenberg M (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4:266–275. [CrossRef Medline](#)
- Hüttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirths O (2015) Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44:1291–1302. [CrossRef Medline](#)
- Isabel G, Pr  at T (2008) Molecular and system analysis of olfactory memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 4:103–118.
- Iwata N, Mizukami H, Shirokani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* 24:991–998. [CrossRef Medline](#)
- Keene AC, Stratmann M, Keller A, Perrat PN, Vosshall LB, Waddell S (2004) Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44:521–533. [CrossRef Medline](#)
- Keene AC, Krashes MJ, Leung B, Bernard JA, Waddell S (2006) *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* 16:1524–1530. [CrossRef Medline](#)
- Knapke S, Kahsai L, Winther AM, Tanimoto H, N  ssel DR (2013) Short neuropeptide F acts as a functional neuromodulator for olfactory memory in kenyon cells of *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci* 33:5340–5345. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Lee PT, Lin HW, Chang YH, Fu TF, Dubnau J, Hirsh J, Lee T, Chiang AS (2011) Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13794–13799. [CrossRef Medline](#)
- Marr RA, Hafez DM (2014) Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front Aging Neurosci* 6.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765–1768. [CrossRef Medline](#)
- Meyer H, Panz M, Zmojdian M, Jagla K, Paululat A (2009) Neprilysin 4, a novel endopeptidase from *Drosophila melanogaster*, displays distinct substrate specificities and exceptional solubility states. *J Exp Biol* 212:3673–3683. [CrossRef Medline](#)
- Meyer H, Panz M, Albrecht S, Drechsler M, Wang S, H  sken M, Lehmachner C, Paululat A (2011) *Drosophila* metalloproteases in development and differentiation: the role of ADAM proteins and their relatives. *Eur J Cell Biol* 90:770–778. [CrossRef Medline](#)
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates Adenylate Cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574. [CrossRef Medline](#)
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L (2010) A physiological role for amyloid-   protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis* 19:441–449. [CrossRef Medline](#)
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012a) The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *Int J Alzheimers Dis* 2012:383796. [CrossRef Medline](#)
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Lewis DI, Pickles AR, Makova NZ, Bagrova DI, Dubrovskaya NM, Plesneva SA, Zhuravin IA, Turner AJ (2012b) Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J Mol Neurosci* 46:569–577. [CrossRef Medline](#)
- Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE (2000) Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296:341–349. [CrossRef Medline](#)
- Panz M, Vitos-Faleato J, Jendretzki A, Heinisch JJ, Paululat A, Meyer H (2012) A novel role for the noncatalytic intracellular domain of Neprilysins in muscle physiology. *Biol Cell* 104:553–568. [CrossRef Medline](#)

- Park MH, Lee JK, Choi S, Ahn J, Jin HK, Park JS, Bae JS (2013) Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice. *Brain Res* 1529: 113–124. [CrossRef Medline](#)
- Pascual A, Pr  at T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117. [CrossRef Medline](#)
- Peris  e E, Burke C, Huetteroth W, Waddell S (2013) Shocking revelations and saccharin sweetness in the study of *Drosophila* olfactory memory. *Curr Biol* 23:R752–R763. [CrossRef Medline](#)
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004) A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117:83–94. [CrossRef Medline](#)
- Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, Mohajeri MH (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A β -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis* 24:475–483. [CrossRef Medline](#)
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, F  a M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28:14537–14545. [CrossRef Medline](#)
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* 277:212–214. [CrossRef Medline](#)
- Rose JB, Crews L, Rockenstein E, Adame A, Mante M, Hersh LB, Gage FH, Spencer B, Potkar R, Marr RA, Masliah E (2009) Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:1115–1125. [CrossRef Medline](#)
- Sitnik JL, Francis C, Hens K, Huybrechts R, Wolfner MF, Callaerts P (2014) Neprilysins: an evolutionarily conserved family of metalloproteases that play important roles in reproduction in *Drosophila*. *Genetics* 196: 781–797. [CrossRef Medline](#)
- Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, Patrick C, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2008) Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular A β and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:109–112. [CrossRef Medline](#)
- Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, Bland ND, Bingham RJ, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE (2005) *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function. *Biochem J* 386:357–366. [CrossRef Medline](#)
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical-conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157:263–277. [CrossRef Medline](#)
- Tully T, Pr  at T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47. [CrossRef Medline](#)
- Turner AJ (2003) Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem Soc Trans*.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261–269. [CrossRef Medline](#)
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269–324. [Medline](#)
- Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG (2000) The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103:805–813. [CrossRef Medline](#)
- Walther T, Albrecht D, Becker M, Schubert M, Kouznetsova E, Wiesner B, Maul B, Schliebs R, Grecksch G, Furkert J, Sterner-Kock A, Schultheiss HP, Becker A, Siems WE (2009) Improved learning and memory in aged mice deficient in amyloid β -degrading neutral endopeptidase. *PLoS ONE* 4:e4590. [CrossRef Medline](#)
- Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang DS (2010) Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem* 115:47–57. [CrossRef Medline](#)
- Wu CL, Shih MF, Lee PT, Chiang AS (2013) An octopamine-mushroom body circuit modulates the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Curr Biol* 23:2346–2354. [CrossRef Medline](#)
- Wu CL, Fu TF, Chou YY, Yeh SR (2015) A single pair of neurons modulates egg-laying decisions in *Drosophila*. *PLoS One* 10:e0121335. [CrossRef Medline](#)
- Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K (1995) Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. *Neuron* 15:45–54. [CrossRef Medline](#)
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919:115–121. [CrossRef Medline](#)
- Yu D, Keene AC, Srivatsan A, Waddell S, Davis RL (2005) *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123:945–957. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Zhou L, Wei C, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang R, Wang D (2013) Distinct subcellular patterns of neprilysin protein and activity in the brains of Alzheimer's disease patients, transgenic mice and cultured human neuronal cells. *Am J Transl Res* 5:608–621. [Medline](#)

Résultats supplémentaires: Nep2 est impliquée dans la formation de la LTM

Un résultat étonnant décrit dans notre article est que Nep2 est la seule néprilysine à ne pas sembler impliquée dans les neurones DPM pour la formation de la LTM. Pour approfondir cette question, nous avons choisi d'exprimer un RNAi-Nep2 dans tout l'organisme de la mouche adulte, à l'aide du système da-Switch (daSw). Ce système inductible est constitué d'une protéine Gal4 fusionnée au récepteur à la progestérone (HR). En absence d'hormone, ce facteur appelé Gal4-Sw est inactif, alors qu'en présence d'hormone (ici, le RU486 apporté dans le milieu de culture des drosophiles), Gal4-Sw peut se fixer sur ses séquences promotrices et activer la transcription (Figure 31).

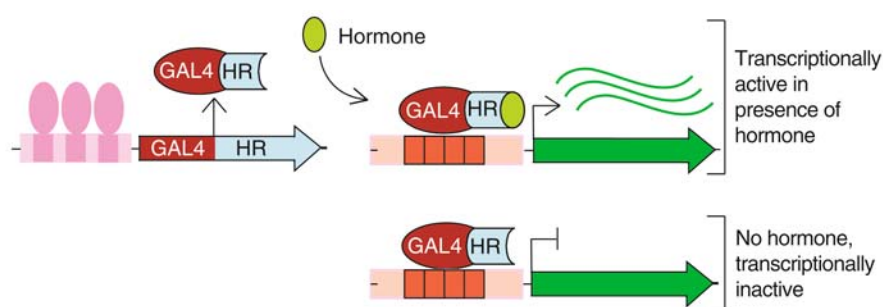


Figure 31 : Système d'induction Gal4-Sw (Elliott and Brand, 1999).

Le facteur de transcription Gal4 est fusionné à un récepteur hormonal à la progestérone et le domaine d'activation de p65. En présence de l'hormone ou d'une molécule analogue, comme le RU486, le facteur Gal4-Sw est activé ce qui permet la transcription du transgène. En l'absence de l'hormone, le facteur Gal4-Sw reste inactif.

Les drosophiles sont placées sur du milieu supplémenté en RU486 pendant 3 jours afin d'induire la transcription du RNAi-Nep2. Lorsque l'expression de Nep2 est diminuée dans tout l'organisme, un défaut de LTM est observé. Les drosophiles non induites, ayant passées 3 jours sur du milieu normal, présentent une LTM normale, indiquant ainsi que le défaut observé est bien dû à l'induction chez l'adulte du RNAi-Nep2 (Figure 32).

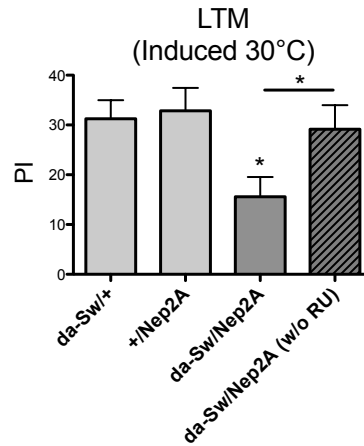


Figure 32 : Nep2 est requise pour la LTM.

Après 3 jours d'induction, l'expression du RNAi-Nep2A dans toutes les cellules sous le contrôle du driver daughterless(da)-Sw provoque un défaut de LTM ($F_{(3,62)} = 3.201$, $p = 0.0297$, $n \geq 14$, test post-hoc Newman-Keuls, *da-Sw/+* vs *da-Sw/Nep2A* $*p < 0.05$, *+Nep2A* vs *da-Sw/Nep2A* $*p < 0.05$). En absence d'induction, les drosophiles *da-Sw/Nep2A* présentent une LTM normale, supérieure à celle des drosophiles induites (test post-hoc Newman-Keuls, *da-Sw/Nep2A* vs *da-Sw/Nep2A (w/o RU)* $*p < 0.05$).

Nos résultats montrent que Nep2 est requise pour la LTM, mais apparemment son expression n'est pas requise dans les neurones DPM. Or nos expériences ont montré une redondance fonctionnelle dans les MB de Nep2 avec Nep3 pour la formation de la LTM, indiquant que Nep2, en plus d'être exprimée dans les neurones DPM, est également exprimée dans les MB. De manière intéressante, Nep2 est la seule néprilysine qui est exclusivement sécrétée. Nous nous sommes alors demandé si la Nep2 présente dans les MB ne pouvait pas « sauver » l'effet de l'inhibition de la Nep2 produite par les neurones DPM. Ainsi la Nep2 produite par une autre structure, les MB, pourrait masquer l'effet causé par l'inhibition de la Nep2 produite par les neurones DPM. Pour étudier cette hypothèse, nous avons placé le RNAi-Nep2 sous le contrôle du driver c316 : ce driver, généralement considéré, à tort, comme spécifique des neurones DPM, marque également quelques cellules de Kenyon ainsi que d'autres structures (Figure 33).

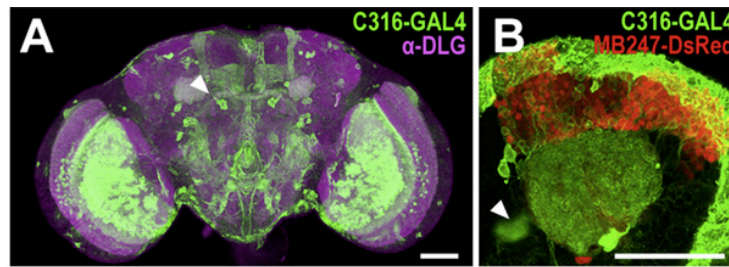


Figure 33 : Patron d'expression du pilote d'expression c316 (Wu et al., 2011).

A. Patron d'expression du driver c316 (GFP en vert) et co-marquage de la protéine DLG (magenta). Les corps cellulaires des neurones DPM sont marqués et l'un d'eux est indiqué par une tête de flèche. De nombreuses autres structures sont marquées, comme les lobes optiques ainsi que le ganglion sous-œsophagien. B. Agrandissement du patron d'expression du driver c316 au niveau des calices des MB (marqués en rouge grâce au driver des MB, MB247). Certaines cellules sont marquées à la fois par c316 et MB247, indiquant que certaines cellules de Kenyon sont marquées par c316.

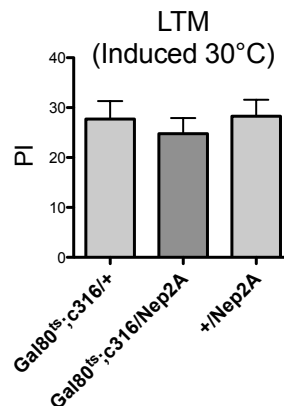


Figure 34 : L'expression d'un RNAi-Nep2 sous le contrôle du pilote d'expression c316 ne provoque pas de défaut de LTM.

($F_{(2,59)} = 0.3111$, $p = 0.7399$, $n = 20$, test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c316/+$ vs $Gal80^{ts};c316/Nep2A$ $p > 0.05$, $+Nep2A$ vs $Gal80^{ts};c316/Nep2A$ $p > 0.05$).

Nos résultats indiquent que les drosophiles exprimant le RNAi-Nep2A sous le contrôle du driver inducible Gal80^{ts};c316 ne présentent pas de défaut de LTM (Figure 34). Ce résultat négatif est difficilement interprétable. On peut néanmoins formuler plusieurs hypothèses:

- le RNAi-Nep2 utilisé ici n'est pas suffisamment exprimé dans les MB pour provoquer un défaut de LTM (nombre insuffisant de neurones marqués, force insuffisante du pilote d'expression...);

- la Nep2 masquant le phénotype causé par son inhibition dans les neurones DPM pourrait provenir d'une structure adjacente, autre que les MB, par exemple les neurones APL ;
- bien que l'expression de Nep2 soit requise dans les neurones DPM pour la LTM, il est possible qu'elle soit nécessaire pour la LTM dans une structure autre que les neurones DPM et les MB.

En conclusion, nous avons pu montrer que Nep2 est elle aussi nécessaire pour la formation de la LTM, sans que la ou les structures dans lesquelles elle est requise n'aient put être identifiées.

II. Article : *Drosophila* Neprilysin 1 rescues the memory deficit caused by amyloid peptide

Introduction

Chez les mammifères, de nombreuses cibles ont été décrites pour les néprilysines. Parmi elles, plusieurs sont liées à la mémoire (peptides A β , dynorphines, enkephalines, somatostatine, substance P...). Chez la drosophile, aucune cible n'a été formellement identifiée pour la formation de la mémoire, même si plusieurs homologues des cibles de mammifères sont exprimés.

De part leur rôle dans la maladie d'Alzheimer, les peptides A β sont la cible la plus étudiée des néprilysines. Il a été montré chez la drosophile que Nep2 pouvait dégrader les peptides A β ₄₂ humains (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008) proposant ainsi que les néprilysines de drosophiles pourraient dégrader des peptides A β .

La production de peptides A β n'a pas été décrite dans des conditions physiologiques chez la drosophile. En revanche Carmine-Simmen et collègues (2009) ont pu montrer que chez des drosophiles de 30 jours surexprimant APPL, ou APPL et dBACE, des agrégats positifs aux tests utilisés pour identifier les plaques amyloïdes humaines se formaient. Cette étude a aussi permis de démontrer le rôle de la structure de ces peptides, plutôt que leur séquence, sur leur fonction toxique. Les auteurs ont pu déterminer un peptide artificiel dA β , qui correspond à la séquence d'APPL où le peptide A β devrait se trouver (d'après les comparaisons avec hAPP). Les drosophiles surexprimant ce peptide présentent des dépôts amyloïdes dans le système nerveux similaires à ceux des drosophiles surexprimant APP, ou APPL et dBACE.

Par conséquent, nous avons cherché à savoir si les peptides A β pouvaient être une cible des néprilysines dont la dégradation permettrait la formation de la mémoire.

Résultats principaux

Nous avons utilisé le peptide artificiel dA β pour déterminer si une interaction fonctionnelle pouvait avoir lieu entre les néprilysines et ces peptides. Dans les MB, la

modulation de l'expression de Nep1 n'impacte pas la mémoire des drosophiles exprimant des peptides amyloïdes, alors que dans les neurones DPM l'expression des peptides est délétère pour la MTM lorsqu'elle est combinée avec une inhibition de l'expression de Nep1. De plus, la surexpression de Nep1 dans les neurones DPM permet de sauver le défaut de LTM dû à l'expression des peptides dA β , indiquant que Nep1 interagit fonctionnellement avec ces peptides dans les neurones DPM. Enfin, nous avons pu montrer que l'activité catalytique de Nep1 est requise pour cette interaction.

Nous avons aussi pu montrer qu'APPL était requis pour la MTM et la LTM dans les neurones DPM. Par conséquent, pour étudier l'implication possible de Nep1 dans la dégradation des peptides endogènes dA β , nous avons cherché à augmenter physiologiquement leur quantité. Augmenter l'expression de dBACE ne cause aucun déficit de mémoire. En revanche, le défaut de MTM et de LTM dû à la diminution de Nep1 est aggravé par l'augmentation de l'expression de dBACE dans les neurones DPM. La surexpression d'APPL dans les neurones DPM ne provoque ni défaut de MTM ni défaut de LTM. Par contre, la surexpression d'APPL et de dBACE conjointement dans les neurones DPM provoque un défaut de MTM et de LTM, probablement dû à une surproduction de peptides dA β . La surexpression de Nep1 permet aussi de sauver ces défauts, démontrant l'interaction entre les peptides endogènes dA β et Nep1.

Article

Title

***Drosophila* neprilysin 1 rescues memory deficits caused by amyloid- β peptide**

Abbreviated title

Nep1 prevents amyloid- β peptide impact on memory

Author names

Oriane Turrel, Valérie Goguel*, Thomas Preat*

Author affiliation

Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

* These authors contributed equally to the work

Corresponding authors

Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: valerie.goguel@espci.fr

Thomas Preat, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI Paris, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: thomas.preat@espci.fr

Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

T.P. received grant support from the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20140329540). We thank Aurélie Lampin-Saint-Amaux, Honorine Lucchi and Noé Testa for technical help, and all the members of our laboratory for valuable discussions and for critically reading this manuscript.

Abstract

Neprilysins are type-II metalloproteinases known to degrade and inactivate a number of small peptides, in particular the mammalian amyloid- β peptide (A β). In *Drosophila*, all four neprilysins expressed in the brain are required for middle-term memory (MTM) in the dorsal paired medial (DPM) neurons, a pair of large neurons that broadly innervate the mushroom bodies (MB), the center of olfactory memory. These data indicate that one or several peptides need to be degraded for MTM. We have previously shown that the fly amyloid precursor protein (APPL) is required for memory in the MB. We show here that APPL is also required in adult DPM neurons for MTM and LTM formation. This finding prompted us to search for an interaction between neprilysins and *Drosophila* A β (dA β), a cleavage product of APPL. To find out whether dA β was a neprilysin's target, we used inducible drivers to modulate neprilysin 1 (Nep1) and dA β expression in adult DPM neurons. We show that Nep1 inhibition makes dA β expression detrimental to both MTM and LTM. Conversely, memory deficits displayed by dA β -expressing flies are rescued by Nep1 overexpression. Consistent with behavioral data, biochemical analyses confirmed that Nep1 degrades dA β . Taken together, our findings establish that Nep1 and dA β expressed in DPM neurons are functionally linked for memory processes, suggesting that dA β is a physiological target for Nep1.

Significant statement

Neprilysins are endopeptidases known to degrade a number of small peptides and in particular the amyloid peptide. We previously showed that all four neprilysins expressed in the *Drosophila* brain are involved in specific phases of olfactory memory. Here we show that an increase in the level of the neprilysin 1 peptidase overcomes memory deficits induced by amyloid peptide in young flies. Taken together the data reveal a functional interaction between neprilysin 1 and amyloid peptide, suggesting that neprilysin 1 degrades amyloid

peptide. These findings raise the possibility that under non-pathological condition mammalian neprilysins degrade amyloid peptide to ensure memory formation.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that first manifests as a memory decline. Its dominant histological hallmark is the accumulation of amyloid- β peptides ($A\beta$) produced by the processing of the amyloid precursor protein (APP) following the amyloidogenic pathway (Turner et al., 2003). This proteolytic pathway is initiated by the rate-limiting enzyme β -secretase (BACE) (Cole and Vassar, 2007). As for any protein, the $A\beta$ steady-state level results from a balance between its synthesis and its degradation. Neprilysins (Nep), known as membrane metallo-endopeptidases, have been highlighted as the main enzyme for $A\beta$ degradation in humans (Turner, 2003; Nalivaeva et al., 2012). It has been shown that Nep level and activity decrease during AD progression, suggesting that a reduction in $A\beta$ degradation may contribute to the development of the disease (Yasojima et al., 2001; Caccamo et al., 2005; Wang et al., 2010; Zhou et al., 2013). In mouse models of AD, an increase in Nep activity ameliorates the memory deficits observed (Poirier et al., 2006; Spencer et al., 2008; Park et al., 2013), whereas Nep deficiency worsens them (Hüttenrauch et al., 2015).

Drosophila melanogaster is a model system well-suited to analyzing the influence of the APP pathway on memory. Importantly, the fly genome contains homologs of 75% of human disease-related genes (Reiter, 2001), and molecules and mechanisms underlying memory processes are conserved from flies to mammals. Though relatively simple, the fly brain is highly organized and sustains complex forms of learning and memory. The mushroom bodies (MB) constitute the central integrative brain structure for olfactory associative memory. They are composed of approximately 4,000 neurons, the Kenyon cells (KC), classified into three subtypes whose axons form five lobes, two vertical (α and α') and three medial (β , β' and γ) (Crittenden et al., 1998).

Four Neps (Nep1-4) are expressed in the *Drosophila* central nervous system (Meyer et al., 2011; Sitnik et al., 2014). We previously showed that they were involved in both middle-term (MTM) and long-term memory (LTM) in the dorsal paired medial (DPM) neurons, a pair of large neurons that broadly innervate all the MB lobes (Turrel et al., 2016). DPM neurons are thought to regulate the MB outcome with a feedback system, a process involved in MTM formation (Keene et al., 2004). Nep1 expression is also required in the MB for MTM and LTM, and functional redundancy is observed between Nep2, Nep3 and Nep4 for LTM formation in the MB (Turrel et al., 2016). The Nep targets involved in memory processes are still unknown.

The fly expresses a single non-essential APP orthologue called APP-Like (APPL) (Rosen et al., 1989; Luo et al., 1992). Importantly, APPL follows proteolytic pathways similar to APP (Poeck et al., 2011), and the homologs of all mammalian secretases have been characterized in the fly (Rooke et al., 1996; Boulianne et al., 1997; Hong and Koo, 1997; Carmine-Simmen et al., 2009). APPL silencing in the MB of adult flies was shown to specifically disrupt MTM and LTM (Goguel et al., 2011; Bourdet et al., 2015a).

It has already been shown that Nep2 can degrade human A β 42 (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008). However, whether or not a *Drosophila* Nep degrades endogenous A β is still an open question. Although there is no sequence similarity at the level of A β sequences between APP and APPL, a *Drosophila* A β -like peptide (dA β) was identified in old flies overexpressing APPL (Carmine-Simmen et al., 2009).

In the work reported here, using conditional expression, we modulated Nep1 and dA β levels in young adult flies. Taken together our findings reveal a functional interaction between Nep1 and amyloid peptide for memory processes.

Materials and Methods

Drosophila stocks. *Drosophila melanogaster* wild-type strain Canton Special (CS) and mutant flies were raised on standard medium at 18°C and 60% humidity with a 12 h light/dark cycle. All the strains used for memory experiments were outcrossed to the CS background. *Nep1*- and *Appl*-RNAi lines were obtained from the Vienna Drosophila Resource Center (VDRC, *Nep1A*: 27537, *Nep1C*: 108860, *Appl*: 108312 and 42673). To overexpress *Nep1* we used the P{EPgy2}*Nep1*^{EY21255} line (*Nep1*^{EY21255}) obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, IN, # 22465). UAS-APPL (APPL) was previously described in (Torroja et al., 1999). UAS-dAβ (dAβ) and UAS-dBACE (dBACE) were kindly provided by Doris Kretzschmar (Carmine-Simmen et al., 2009). To generate a *Nep1* mutant, a 2.59 kb PCR fragment was amplified using the *Nep1* cDNA as a template (Drosophila Genomics Resource Center, Bloomington, IN, # GH03315), and cloned into the BglII site of pUAST (Brand and Perrimon, 1993). The resulting plasmid was verified by sequencing, and the 1.24 kb BstEII-KpnI restriction fragment was replaced by the mutant fragment obtained from GenScript. The mutated *Nep1* (*Nep1*^{mut}) displays a mutation in position 685 (E → V) that disrupts the catalytic activity of the enzyme (Devault et al., 1988). GAL4 drivers used were *VT64246* (VDRC, # 264246) for expression in DPM neurons and *c739* for expression in MB α/β neurons. We used the TARGET system to specifically induce RNAi expression in adults (McGuire et al., 2003). To achieve GAL4 induction, flies were kept at 30°C for 3 d before conditioning, and until memory test for LTM analyses.

Behavioral experiments. Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described by Pascual and Preat (2001). Training and testing were performed at 25°C and 80% humidity. Conditioning was performed on samples of 25–35 flies aged between 4 and 5 d with 3-octanol (~95% purity, Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol

(99% purity, Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International). Memory tests were performed with a T-maze apparatus (Tully and Quinn, 1985). Flies were given 1 min to choose between two arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the number in both. The average of two reciprocal experiments gave a performance index (PI). For learning analyses, flies were tested immediately after a single training cycle. To assess MTM, flies underwent one-cycle training, and memory was tested 2 h later. For LTM analyses, flies were trained with 5 cycles spaced at 15 min rest intervals, and tested 24 h later. For odor avoidance tests after electric shock and response to electric shock, flies were treated as described by Pascual and Preat (2001).

Quantitative PCR analyses. For *elav* genotypes, flies were raised at 25°C. *Gal80^{ts};VT64246* flies were raised at 18°C and GAL4-transcription was induced for 3 d at 30°C prior to RNA extraction. Total RNA was extracted from 60 female heads using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Preparations underwent a DNaseI treatment (Biolabs) for 15 min at 37°C. DNase was heat-inactivated with EDTA (10 mM). Samples were cleaned with the RNA Minielute Cleanup kit (Qiagen), and reverse-transcribed with oligo(dT)₂₀ primers using the SuperScript III First-Strand kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Level of the target cDNA was compared against level of α -Tub84B (Tub, CG1913) cDNA used as a reference. Amplification was performed using a LightCycler 480 (Roche) and the SYBR Green I Master mix (Roche). Reactions were carried out in triplicate. Specificity and size of amplification products were assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis, respectively. Expression relative to reference is expressed as a ratio ($2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the crossing point).

Western blot analyses. To analyze dA β level we used a *tub-Gal80^{ts};elav* pan-neuronal driver. Proteins were extracted from 50 female fly heads after 48 h of induction at 30°C. Samples were prepared as in Burnouf et al. (2015). Soluble proteins were separated using SDS-PAGE gels containing a gradient of 10–20% acrylamide (NovexTM 10-20% Tricine, Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were cut into two parts: the lower one was probed with anti-HA (ab130275, Abcam, 1:10,000 dilution), and the upper one was probed with anti- α -Tub (T6199; Sigma-Aldrich, 1:40,000 dilution). Western blots were routinely developed using the ECL system (Life Technologies). Protein levels were quantified using ImageQuant TL software (GE Healthcare), and expressed as a ratio relative to α -Tub.

Experimental design and statistical analyses. For behavioral experiments, memory scores were displayed as mean $\pm$ SEM. Scores resulting from all genotypes were analyzed using one-way ANOVA followed, if significant at $p \leq 0.05$, by Newman-Keuls multiple comparison tests. Overall ANOVA p -value is given in the legends along with the value of the corresponding Fisher distribution $F_{(x,y)}$, where x is number of degrees of freedom for groups and y is the total number of degrees of freedom for the distribution. Asterisks in the figure denote the least significant of the pairwise *post hoc* comparisons between the genotype of interest and its controls, following the usual nomenclature. Quantitative mRNA measurements were analyzed from $2^{-\Delta C_p}$ using Student's t -tests, with significance threshold set at $p \leq 0.05$. Western blot quantification was analyzed using Student's one sample t -test.

Results

Modulation of Nep1 expression in the adult MB does not impact memory of flies expressing dA β

We previously showed that Nep1 expression is required in the α/β neurons of the MB for MTM (Turrel et al., 2016). Using a classical conditioning paradigm in which an odorant is paired with the delivery of electric shocks, the fly is able to form six discrete aversive memory phases reflected at the neural network level (Bouzaiane et al., 2015). Learning is measured immediately after a single conditioning, while MTM is assessed 1–3 h later. The fly can also produce two antagonistic forms of consolidated memory (Isabel et al., 2004). Among them, the robust LTM is only formed after multiple conditioning cycles spaced by rest intervals. Crucially, LTM is the only memory phase dependent on *de novo* protein synthesis (Tully et al., 1994).

To find out whether amyloid peptide was a target for Nep1 for memory processes, we proceeded to modulate Nep1 expression in transgenic flies expressing *Drosophila* amyloid peptides. To this end, we used a construct allowing expression of a *Drosophila* A β peptide (dA β) derived from APPL (Carmin-Simmen et al., 2009). dA β ectopic expression in the MB was achieved with the c739 driver that labels the α/β KC (Yang et al., 1995). To restrict GAL4 expression to adulthood, we used a *tub-Gal80^{ts};c739* line (*Gal80^{ts};c739*) that ubiquitously expresses a thermo-sensitive GAL4 inhibitor (*Gal80^{ts}*) inactive at 30°C (McGuire et al., 2003). As previously shown (Bourdet et al., 2015b), dA β expression in the adult α/β KC did not impair MTM (Figure 1A). To determine whether Nep1 could functionally interact with dA β , we examined whether the MTM deficit displayed by Nep1-knockdown flies (Turrel et al., 2016) was exacerbated by dA β expression: if Nep1 degrades dA β , then Nep1 knockdown should lead to an increase in dA β level that might impair MTM formation.

To reduce Nep1 expression, we used specific RNAi constructs. The RNAi-Nep1A construct leads to a 75% decrease in Nep1 expression in *elav/RNAi-Nep1A* flies, and caused a MTM deficit when expressed in adult α/β KC (Turrel et al., 2016). Concomitant dA β overexpression did not further affect MTM of RNAi-Nep1A-expressing flies (Figure 1B). We next used a second non-overlapping construct, RNAi-Nep1C. qPCR experiments showed that *elav/RNAi-Nep1C* flies exhibited a 63% decrease in Nep1 expression (Figure 1C). We further observed that reducing Nep1 expression in adult α/β KC to a smaller extent than that previously achieved with the RNAi-Nep1A construct appeared to have no impact on MTM (Figure 1D). Concomitant dA β overexpression did not alter MTM (Figure 1D). Thus reducing Nep1 level in adult α/β KC of flies expressing amyloid peptide did not reveal any functional interaction between Nep1 and dA β .

We next analyzed LTM and observed that *Gal80^{ts};c739/dA β* induced flies displayed a severe LTM defect, while non-induced flies showed normal LTM scores (Figure 1E). We analyzed the sensory-motor capacities of the *Gal80^{ts};c739/dA β* flies, and found that they displayed normal shock reactivity and olfactory acuity (Table 1). We conclude that dA β expression in adult α/β KC induces a LTM deficit. We thus asked whether Nep1 overexpression would alleviate the LTM defect caused by dA β expression. To this end, we took advantage of the *Nep1^{EY21255}* line that contains a P-element inserted upstream of the first non-coding Nep1-RA exon. This P-element construct carries UAS binding sites for the GAL4 transcriptional regulator, allowing GAL4-mediated expression of genes proximate to the site of the insertion (Bellen et al., 2004). It was previously shown that this line allows Nep1 overexpression (Panz et al., 2012). We performed qPCR experiments to assess Nep1 expression level in *elav/Nep1^{EY21255}* flies. The data show that fly heads express a 2.4-fold increase in *Nep1* mRNA level (Figure 1F).

Flies overexpressing Nep1 (*Gal80^{ts};c739/Nep1^{EY21255}*) showed normal LTM (Figure 1E). Simultaneous overexpression of Nep1 and dA β in adult α/β KC did not rescue the LTM deficit caused by dA β expression (Figure 1E). In conclusion, we did not observe any functional interaction when Nep1 expression was modulated in the MB of dA β -expressing flies

dA β expression impairs MTM formation when combined with Nep1 knockdown in adult DPM neurons

As Nep1 expression was also shown to be required in DPM neurons for memory formation (Turrel et al., 2016), we repeated the experiments using a *tub-Gal80^{ts};VT64246* GAL4-line (*Gal80^{ts};VT64246*) in order to drive specific expression in adult DPM neurons. We first expressed dA β in adult DPM neurons. Like dA β expression driven in KC, expression driven in adult DPM neurons did not impact MTM (Figure 2A). As previously reported (Turrel et al., 2016), RNAi-Nep1A expression in adult DPM neurons led to an MTM defect (Figure 2B). Strikingly, concomitant dA β expression aggravated the MTM defect caused by Nep1 inhibition in DPM neurons (Figure 2B). In the absence of GAL4 induction, all genotypes showed normal MTM scores (Figure 2B). We verified that the ability of induced *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1A* flies to avoid electric shocks and their olfactory acuity to each odor after electric shock exposure, were unaffected (Table 2). We next analyzed learning capacity, and observed that like *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A* flies (Turrel et al., 2016), *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1A* flies exhibited normal learning (Figure 2C). Thus, the association of Nep1 knockdown with dA β expression in adult DPM neurons does not perturb learning.

To confirm these results, we used RNAi-Nep1C. Similarly to its expression in KC, its expression driven in adult DPM neurons did not impact MTM (Figure 2D), probably because

this RNAi induces a smaller decrease in Nep1 than RNAi-Nep1A. Interestingly, while flies expressing only RNAi-Nep1C showed normal MTM, flies expressing both dA β and RNAi-Nep1C showed an MTM deficit (Figure 2D). As expected, this deficit was not observed in the absence of GAL4 induction (Figure 2D). We verified that the ability of induced *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1C* flies to perceive conditioning stimuli was normal (Table 2). We conclude that in DPM neurons, Nep1 reduction makes dA β overexpression detrimental for MTM, revealing a functional link between Nep1 and dA β . We hypothesize that Nep1 reduction leads to a failure in dA β degradation, thus generating increased levels of dA β that impair memory.

To directly assess the effect of Nep1 inhibition on dA β levels, we used the HA tag-sequence inserted downstream of the dA β sequence (Carmine-Simmen et al., 2009). We used a *tub-Gal80^{ts};elav* line (*Gal80^{ts};elav*) to drive dA β pan-neuronal expression in adult flies. Head protein extracts were analyzed by Western blotting. Quantification revealed that dA β levels were increased when Nep1 was knocked down (Figure 2E). The data indicate that Nep1 degrades dA β , consistent with functional analyses described above.

Nep1 overexpression in adult DPM neurons rescues the LTM defect caused by dA β expression

We next examined the Nep1-dA β interaction in LTM formation. Like expression in KC, dA β expression in DPM neurons caused a strong LTM defect (Figure 3A). In the absence of induction, no LTM defect was observed (Figure 3A). We tested the sensory-motor capacities of *Gal80^{ts};VT64246/dA β* flies, and found that they displayed wild-type shock reactivity and olfactory acuity (Table 3). We conclude that like expression in the MB, dA β expression in adult DPM neurons induces a LTM deficit. We went on to determine whether Nep1 overexpression could overcome the negative effect of dA β expression on LTM. We observed

that *Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}* flies overexpressing Nep1 in adult DPM neurons showed normal LTM (Figure 3A). Strikingly, flies that overexpressed Nep1 in addition to dAβ in adult DPM neurons showed wild-type LTM (Figure 3A), suggesting that Nep1 enzyme could degrade dAβ. We reasoned that the presence of two UAS-GAL4 could result in the decreased expression of each of them caused by GAL4 dilution. Thus to check that the rescued phenotype observed was not caused by a decrease in dAβ expression, we performed qPCR experiments to measure dAβ mRNA level in *Gal80^{ts};VT64246/dAβ* and *Gal80^{ts};VT64246/dAβ;Nep1^{EY21255}* fly heads. We observed that dAβ expression was not decreased by the presence of *Nep1^{EY21255}* (Figure 3B). We thus conclude that in DPM neurons, Nep1 overexpression rescues the LTM deficit caused by dAβ expression.

Finally, we examined whether the capacity of Nep1 overexpression to overcome dAβ-induced LTM defect was mediated by its catalytic activity. To this end, we generated a Nep1 form with a mutation in its catalytic site (Devault et al., 1988). To verify the expression level of this mutated Nep1 protein (Nep1^{mut}), we performed qPCR experiments with oligonucleotides that amplify *Nep1* both wild type and mutant sequences. We observed that *Nep1* mRNA levels were increased 5.7-fold in *elav/Nep1^{mut}* fly heads compared to the *elav/+* control, showing efficient Nep1^{mut} expression (Figure 3C). Nep1^{mut} expression in adult DPM neurons did not affect LTM (Figure 3D). Flies expressing both dAβ and Nep1^{mut} showed LTM scores similar to that of flies expressing only dAβ (Figure 3E). Thus unlike wild-type Nep1 overexpression, that of Nep1^{mut} does not rescue the LTM defect caused by dAβ expression in adult DPM neurons, indicating that the LTM rescue previously observed depends on Nep1 catalytic activity.

APPL is required in adult DPM neurons for both MTM and LTM

As we evidenced a functional interaction between ectopic dA β and Nep1 activity in adult DPM neurons, we next investigated whether DPM neurons could physiologically express the amyloid peptide. Because APPL is highly expressed in the MB, it could be difficult to determine with immunohistochemistry experiments staining corresponding to DPM neuritis in addition to MB lobes. Instead we asked whether APPL expression, if any, was required for memory in DPM neurons. We used two non-overlapping RNAi constructs (RNAi-42673, Goguel et al., 2011; RNAi-108312, Bourdet et al., 2015a) to specifically inhibit APPL expression in adult DPM neurons. Interestingly, *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673* and *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312* flies displayed both mutant MTM (Figure 4A) and mutant LTM (Figure 4B). Non-induced flies displayed normal MTM (Figure 4C) and LTM scores (Figure 4D), showing that the deficits were specifically caused by induction of APPL RNAi in adult DPM neurons. Next we analyzed learning and observed that RNAi-APPL induced flies showed normal learning performance (Figure 4E). We checked that induced flies showed normal shock reactivity and normal olfactory acuity to each odor after electric shock exposure (Table 4). We conclude that in addition to expression in the MB, APPL expression in DPM neurons is required for both MTM and LTM processes. APPL being expressed in DPM neurons, dA β may possibly be produced physiologically by adult DPM neurons.

dBACE overexpression aggravates MTM and LTM defects caused by Nep1 knockdown in adult DPM neurons

We next asked whether overexpression of endogenous dA β impaired memory. The first enzyme responsible for dA β synthesis is the dBACE rate-limiting enzyme (Carmine-Simmen et al., 2009). Using an UAS-dBACE construct that encodes the fly β -secretase (Carmine-Simmen et al., 2009), we analyzed the effect on memory of dBACE overexpression in adult

DPM neurons. After induction, *Gal80^{ts};VT64246/dBACE* flies showed both normal MTM and normal LTM (Figure 5A). If dBACE overexpression results in dA β overproduction, dA β level remains insufficient to disrupt memory. We reasoned that if Nep1 can degrade endogenous A β peptide, Nep1 knockdown should cause a further increase in dA β level that could thus reach a level where it could impair memory. Interestingly, flies expressing both RNAi-Nep1A and dBACE in DPM neurons showed an MTM deficit significantly higher than that of flies expressing only RNAi-Nep1A (Figure 5B). Non-induced *Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A* flies displayed normal MTM scores (Figure 5B). Similar results were observed for LTM: flies expressing both RNAi-Nep1A and dBACE in DPM neurons showed a significantly higher LTM deficit than flies expressing only RNAi-Nep1A, while in the absence of GAL4 induction, these flies showed normal scores (Figure 5C). We verified that induced flies showed normal response to electric shock exposure and normal olfactory acuity (Table 5). Taken together, the data reveal a functional interaction between dBACE and Nep1, suggesting that dBACE overexpression produces a substrate for Nep1. On Nep1 knockdown, an accumulation of this substrate, presumably dA β , impairs memory.

Nep1 overexpression rescues the LTM deficit caused by APPL and dBACE co-expression in adult DPM neurons

It has been shown that dBACE constitutive neuronal co-expression with APPL generates numerous amyloid deposits in old flies (Carmine-Simmen et al., 2009). As we observed that dBACE overexpression alone did not impair memory, we analyzed dBACE co-expression with APPL. First, we assessed APPL overexpression alone. Like dBACE, APPL overexpression driven in adult DPM neurons did not impact MTM (Figure 6A). By contrast, flies overexpressing both APPL and dBACE showed decreased MTM scores compared with control flies (Figure 6A). In the absence of GAL4 induction, these flies showed normal MTM

(Figure 6A). We verified that induced *Gal80^{ts};VT64246/APPL;dBACE* flies displayed normal responses to the conditioning stimuli (Table 6). In conclusion, while neither APPL nor dBACE overexpression alone impacts MTM, concomitant overexpression does, and this effect is very likely caused by an overproduction of dA β . We further observed that flies overexpressing Nep1 in addition to APPL and dBACE showed normal MTM (Figure 6A), indicating that Nep1 overexpression rescues the MTM deficit generated by APPL and dBACE co-expression. We conclude that Nep1 acts in the same pathway as APPL and dBACE.

We next analyzed LTM. Like dBACE, APPL overexpression in adult DPM neurons had no impact on LTM (Figure 6B). In sharp contrast, APPL and dBACE co-expression caused a LTM deficit that was not observed in the absence of induction (Figure 6B). Strikingly, concomitant overexpression of Nep1 resulted in normal LTM (Figure 6B).

We then checked that flies co-expressing APPL, dBACE and Nep1 expressed APPL and dBACE at similar levels to flies co-expressing only APPL and dBACE. We first examined whether APPL and dBACE overexpression could be assessed by qPCR experiments driven on cDNA synthesized from *Gal80^{ts};VT64246/APPL;dBACE* fly heads RNA. We observed a significant increase in APPL level in *Gal80^{ts};VT64246/APPL;dBACE* fly heads compared with that of the control (Figure 6C). In addition, we observed a substantial increase in dBACE expression in *Gal80^{ts};VT64246/APPL;dBACE* flies compared with the control (Figure 6C). We next observed that flies co-expressing APPL, dBACE and Nep1 did not express less APPL, or less dBACE than flies co-expressing only APPL and dBACE (Figure 6D).

In conclusion, the data show that the negative effect on MTM and LTM of APPL and dBACE co-expression is rescued by Nep1 overexpression (Figure 6E).

Discussion

We showed previously that Nep1 is required in KC and DPM neurons for MTM and LTM, revealing that one or several neuropeptides need to be degraded for memory formation. Here we report that in adult DPM neurons, Nep1 inhibition makes dA β expression detrimental to both MTM and LTM. Conversely, Nep1 overexpression rescues dA β -induced memory defects. Altogether, the data strongly suggest that Nep1 expressed in DPM neurons degrades dA β , raising the possibility that dA β is a Nep1 physiological substrate for memory processes.

Drosophila is currently used to model AD, in particular A β -induced toxicity (Iijima et al., 2004; Fang et al., 2012; Lin et al., 2014; Niccoli et al., 2016; Sofola-Adesakin et al., 2016). Transgenic flies overexpressing human A β 42 in the eyes display dose- and age-dependent phenotypes that are alleviated by Nep2 up-regulation (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008). One of the limits of these models is that ectopic human A β is expressed constitutively, and is therefore highly toxic, probably by disrupting normal development and/or cell physiology. Here we carried out an inducible analysis of dA β expression in young flies, thereby providing a more physiological model. We observe identical memory phenotypes when dA β is expressed either in KC or in DPM neurons of young flies: MTM is normal while LTM is disrupted. One hypothesis is that dA β expression alters general functional features of the neuron biology and that its toxicity is therefore unspecific to memory. However, dA β -expressing flies show normal reactivity to the conditioning stimuli used, and display normal MTM, suggesting that such dA β production might instead interfere with specific mechanisms in play for memory formation. One hypothesis is that dA β impacts mechanisms specific to LTM. Alternatively, dA β expression level may be an important feature for both MTM and LTM: dA β levels reached in our experiments may alter LTM, but may not be sufficient to alter MTM. We favor this latter hypothesis as APPL and dBACE co-expression disrupts both MTM and LTM. Indeed, as overexpression of APPL or dBACE alone does not affect

memory, we conclude that memory defects observed on co-expression result from APPL processing by dBACE, and thus very likely from dA β production.

In addition to A β , APP complex processing leads to numerous biologically active fragments, that are secreted, membranous or intracellular (O'Brien and Wong, 2011; Zheng and Koo, 2011). We previously showed that a secreted APPL and a noncleaved APPL form were involved in MTM in adult α/β KC (Bourdet et al., 2015a). We now show that APPL expression is also required in DPM neurons. Interestingly, APPL conditional silencing specifically in KC or in DPM neurons leads to similar phenotypes: MTM and LTM are impaired while learning remains unaffected. These data highlight the close relationship between DPM neurons and KC, a circuit thought to stabilize memories (Keene et al., 2004; Pitman et al., 2011), and suggest that APPL play similar roles in both neuronal structures. In mammals, APP is expressed at presynaptic and postsynaptic sites (Yamazaki et al., 1995; Back et al., 2007; Hoe et al., 2009), and APP/APP transdimers have been shown to play a role in synaptic connectivity (Wang et al., 2009). It is therefore possible that APPL/APPL transdimers play a role at KC/DPM synapses. Another hypothesis is that an APPL fragment secreted from one cell type is a ligand for APPL located at the membrane of the other cell type, consistent with reports suggesting that APPL may function as a receptor (Cassar and Kretschmar, 2016).

Nep peptidases constitute the main A β -degrading enzymes in mammals. They have also been implicated in diverse pathologies, but their substrates have remained poorly described. In *Drosophila*, a non-identified neprilysin-like neuropeptidase was shown to play a role in the regulation of the pigment dispersing factor signaling within circadian neural circuits (Isaac et al., 2007). More recently, Nep4 was shown to be involved in the expression of a number of insulin-like peptides (Hallier et al., 2016). Our data show that an increased expression of dA β is detrimental to memory. In a context where dA β level is below a deleterious threshold,

knocking down Nep1 is sufficient to raise this level above the threshold, thus leading to memory deficits. Conversely, if dA β level is above a deleterious threshold, concomitant overexpression of Nep1 restores wild-type memory. Although a non-catalytic role has been described for Nep4 intracellular domain (Panz et al., 2012), Nep1 catalytic activity is required to observe the rescue of the dA β -induced memory deficit, indicating that Nep1 degrades dA β . This conclusion is further supported by Western blot experiments showing that Nep1 inhibition results in an increase in dA β levels. Taken together, our data strongly suggest that Nep1, a membrane proteinase whose active site faces the extracellular compartment, cleaves and inactivates dA β in the extracellular space, consistent with the consensus that Nep function is to turn off neuropeptide signals at the synapse (Turner, 2003).

A functional interaction between Nep1 and dA β is evidenced when modulation of their expression is achieved in DPM neurons, and not in KC. One hypothesis is that Nep1 is not expressed at the synapses where dA β is secreted in α/β KC. Another possibility is that Nep1 is differently regulated in α/β KC and DPM neurons, leading to distinct specificity: Nep peptidases exhibit high substrate variability and are thus known to target numerous peptides (Turner et al., 2001; Nalivaeva et al., 2012). A recent study suggested that Nep4 activity in the central nervous system affected different neuropeptide regulatory systems from the corresponding muscle-bound activity (Hallier et al., 2016). Thus Nep1 expressed at DPM membranes could target dA β , and a distinct peptide when expressed in KC.

Learning and memory are associated with activity-dependent functional plasticity and changes in the structure and number of synapses (Korte and Schmitz, 2016). In AD patients, synaptic dysfunction has been closely correlated with cognitive decline (Querfurth and LaFerla, 2010). A large body of evidence points to a pathological role of A β , particularly as a primary cause of synaptic failure (Hardy and Selkoe, 2002; O'Brien and Wong, 2011). Importantly, A β is present in the cerebrospinal fluid of healthy individuals, though at much

lower concentrations than its neurotoxic concentrations, suggesting the possibility of a physiological role for A β (Fedele et al., 2015). In primary cultures of neurons, immunodepletion of endogenous A β causes neuronal cell death, a phenomenon rescued by addition of physiological picomolar levels of A β peptides (Plant et al., 2003). Furthermore, several reports have shown that at very low physiological concentrations, A β modulates synaptic strength (Kamenetz et al., 2003; Abramov et al., 2009). Puzzo and coworkers (2008) reported that picomolar amounts of A β were able to enhance LTP and hippocampal-dependent memory in mice, whereas nanomolar concentrations of the peptide gave opposite results. Several additional studies confirmed the role of A β at low concentrations in synaptic plasticity and memory (Garcia-Osta and Alberini, 2009; Morley et al., 2010; Puzzo et al., 2011), suggesting that A β physiologically produced in the healthy brain during neuronal activity is needed for memory processes. Thus A β appears to be a modulator of synaptic activity whose concentration needs to be strictly regulated: at the level of its production, degradation or trafficking. We report here in *Drosophila* that memory disruption caused by an increased synthesis of dA β is rescued by Nep1 overexpression, raising the possibility that Nep-dependent degradation of dA β plays a physiological role in memory. A deficit in A β degradation would thus trigger memory deficits, the first cognitive signs of AD. Such mechanisms are consistent with evidence showing that late-onset AD is associated with impaired clearance of A β (Mawuenyega et al., 2010), and that AD brains show decreased levels of Nep expression and activity (Yasojima et al., 2001; Caccamo et al., 2005; Wang et al., 2010; Zhou et al., 2013).

References

- Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.
- Akalal DBG, Yu D, Davis RL (2010) A Late-Phase, Long-Term Memory Trace Forms in the γ Neurons of *Drosophila* Mushroom Bodies after Olfactory Classical Conditioning. *J Neurosci* 30:16699–16708.
- Aldrich BT, Kasuya J, Faron M, Ishimoto H, Kitamoto T (2010) The amnesiac gene is involved in the regulation of thermal nociception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 24:33–41.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2015) Amyloid- β protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12:32–46.
- Barnes K, Turner AJ, Kenny AJ (1992) Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurochem* 58:2088–2096.
- Barnstedt O, Oswald D, Felsenberg J, Brain R, Moszynski J-P, Talbot CB, Perrat PN, Waddell S (2016) Memory-Relevant Mushroom Body Output Synapses Are Cholinergic. *Neuron* 89:1237–1247.
- Baumkotter F, Schmidt N, Vargas C, Schilling S, Weber R, Wagner K, Fiedler S, Klug W, Radzimanowski J, Nickolaus S, Keller S, Eggert S, Wild K, Kins S (2014) Amyloid Precursor Protein Dimerization and Synaptogenic Function Depend on Copper Binding to the Growth Factor-Like Domain. *J Neurosci* 34:11159–11172.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23:213–227.
- Ben Khalifa N, Tyteca D, Marinangeli C, Depuydt M, Collet JF, Courtoy PJ, Renauld JC, Constantinescu S, Octave JN, Kienlen-Campard P (2012) Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *The FASEB Journal* 26:855–867.
- Bernards A, Hariharan IK (2001) Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11:274–278.
- Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, Saki N (2015) Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*:1–11.

- Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Bland ND, Robinson P, Thomas JE, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE (2009) Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2. *Peptides* 30:571–574.
- Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *NeuroReport* 8:1025–1029.
- Bourdet I, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2015a) Amyloid- β Peptide Exacerbates the Memory Deficit Caused by Amyloid Precursor Protein Loss-of-Function in *Drosophila*. *PLoS ONE* 10:e0135741–14.
- Bourdet I, Preat T, Goguel V (2015b) The Full-Length Form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein Is Involved in Memory Formation. *J Neurosci* 35:1043–1051.
- 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.
- 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.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 82:239–259.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.
- Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Grönke S, Partridge L (2015) A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 in vivo. *Acta Neuropathologica* 130:35–47.
- Busto GU, Cervantes-Sandoval I, Davis RL (2010) Olfactory Learning in *Drosophila*. *Physiology* 25:338–346.
- Cabrero P, Radford JC, Broderick KE, Costes L, Veenstra JA, Spana EP, Davies SA, Dow JAT (2002) The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *J Exp Biol* 205:3799–3807.
- Cao W, Song HJ, Gangi T, Kelkar A, Antani I, Garza D, Konsolaki M (2008) Identification of Novel Genes That Modify Phenotypes Induced by Alzheimer's β -Amyloid Overexpression in *Drosophila*. *Genetics* 178:1457–1471.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tschäpe J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretzschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Caron SJC, Ruta V, Abbott LF, Axel R (2013) Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* 497:113–117.

- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.
- Colombo S, Broggi S, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Martegani E (2017) Detection of cAMP and of PKA activity in *Saccharomyces cerevisiae* single cells using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) probes. *Biochem Biophys Res Commun* 487:594–599.
- Comas D, Petit F, Preat T (2004) *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430:460–463.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Dauwalder B, Davis RL (1995) Conditional rescue of the dunce learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes. *J Neurosci* 15:3490–3499.
- Davis RL (2011) Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70:8–19.
- Davis RL, Cherry J, Dauwalder B, Han PL, Skoulakis E (1995) The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Mol Cell Biochem* 149-150:271–278.
- de Belle SJ, Heisenberg M (1994) Associative Odor Learning in *Drosophila* Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies. *Science* 263:692–695.
- DeZazzo J, Xia SZ, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999) Developmental expression of an amn(+) transgene rescues the mutant memory defect of amnesiac adults. *J Neurosci* 19:8740–8746.
- Didelot G, Molinari F, Tchénio P, Comas D, Milhiet E, Munnich A, Colleaux L, Preat T (2006) Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313:851–853.
- Dubnau J, Chiang A-S (2013) Systems memory consolidation in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* 23:84–91.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1684–1688.
- Dudai Y, Uzzan A, Zvi S (1983) Abnormal activity of adenylate cyclase in the *Drosophila* memory mutant rutabaga. *Neuroscience Letters* 42:207–212.
- Dura J-M, Preat T, Tully T (1993) Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 21:307–320.
- Elliott DA, Brand AH (1999) The GAL4 System. *Nature* 400:457–461.
- Farca Luna AJ, Perier M, Seugnet L (2017) Amyloid Precursor Protein in *Drosophila* Glia Regulates Sleep and Genes Involved in Glutamate Recycling. *J Neurosci* 37:4289–4300.
- Fiala A, Spall T (2003) In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic

- cameleon expression. *Sci STKE* 2003:PL6–pl6.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's A β ₄₂-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Freeman MR (2015) *Drosophila Central Nervous System Glia*. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7:a020552–15.
- Freeman MR, Doherty J (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci* 29:82–90.
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A β pathology. *Neurosci Res* 43:39–56.
- Gao Q, Yuan B, Chess A (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3:780–785.
- Garcia-Osta A, Alberini CM (2009) Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* 16:267–272.
- George S, Petit GH, Gouras GK, Brundin P, Olsson R (2013) Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators and Selective Estrogen Receptor β Agonists Moderate Cognitive Deficits and Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci* 4:1537–1548.
- 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.
- Goedhart J, Gadella TWJ (2009) Fluorescence resonance energy transfer imaging of PKC signalling in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *Journal of The Royal Society Interface* 6:S27–S34.
- Goguel V, Belair AL, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Gouras GK, Olsson TT, Hansson O (2014) β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 12:3–11.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2010) Intraneuronal A β ₄₂ Accumulation in Human Brain. *AJPA* 156:15–20.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P, Deschodt-Lanckman M (1997) Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) Degradation by the Neutral Endopeptidase EC 3.4.24.11. *Biochem Pharmacol* 54:509–515.

- Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77.
- Gunawardena S, Goldstein LS (2001) Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32:389–401.
- Hallier B, Schiemann R, Cordes E, Vitos-Faleato J, Walter S, Heinisch JJ, Malmendal A, Paululat A, Meyer H (2016) *Drosophila* neprilysins control insulin signaling and food intake via cleavage of regulatory peptides. *eLife* 5:250.
- Han Z, Jin L, Platasa J, Cohen LB, Baker BJ, Pieribone VA (2013) Fluorescent Protein Voltage Probes Derived from ArcLight that Respond to Membrane Voltage Changes with Fast Kinetics. *PLoS ONE* 8:e81295–e81299.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, Svoboda K (2008) A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19264–19269.
- Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2002) Higher brain functions of PACAP and a homologous *Drosophila* memory gene amnesiac: insights from knockouts and mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 297:427–432.
- Haynes PR, Christmann BL, Griffith LC (2015) A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 4:e03868.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüdcke T, Kretschmar von H, Koch von C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO Journal* 23:4106–4115.
- Hong CS, Koo EH (1997) Isolation and characterization of *Drosophila* presenilin homolog. *NeuroReport* 8:665–668.
- Hüttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirths O (2015) Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44:1291–1302.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) A β 42 Mutants with Different Aggregation Profiles Induce Distinct Pathologies in *Drosophila*. Lashuel H, ed. *PLoS ONE* 3:e1703–e1708.
- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for

- Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6623–6628.
- Imai T, Sakano H, Vosshall LB (2010) Topographic mapping--the olfactory system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001776.
- Isabel G, Pascual A, Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304:1024–1027.
- Isabel G, Preat T (2008) Molecular and system analysis of olfactory memory in *Drosophila*. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*.
- Isbert S, Wagner K, Eggert S, Schweitzer A, Multhaup G, Weggen S, Kins S, Pietrzik CU (2011) APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. *Cell Mol Life Sci* 69:1353–1375.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 5:52–77.
- Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S-I, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Saido TC (2004) Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid-beta Peptide in Mouse Brain. *J Neurosci* 24:991–998.
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70:493–500.
- Jacobsen KT, Iverfeldt K (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* 66:2299–2318.
- Jefferis GSXE, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlfsing T, Maurer CR, Luo L (2007) Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128:1187–1203.
- Jin L, Han Z, Platasa J, Woollorton JRA, Cohen LB, Pieribone VA (2012) Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* 75:779–785.
- Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH (2005) A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J Exp Biol* 208:1239–1246.
- Kakiya N, Saito T, Nilsson P, Matsuba Y, Tsubuki S, Takei N, Nawa H, Saido TC (2012) Cell Surface Expression of the Major Amyloid- β Peptide (A β)-degrading Enzyme, Neprilysin, Depends on Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase (MEK) and Dephosphorylation by Protein Phosphatase 1a. *J Biol Chem* 287:29362–29372.
- Kandel E, Abel T (1995) Neuropeptides, Adenylyl-Cyclase, and Memory Storage. *Science* 268:825–826.
- Keene AC, Krashes MJ, Leung B, Bernard JA, Waddell S (2006) *Drosophila* dorsal paired

- medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* 16:1524–1530.
- Keene AC, Stratmann M, Keller A, Perrat PN, Vosshall LB, Waddell S (2004) Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44:521–533.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Schally AV (2011) Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22:311–317.
- Knappek S, Sigrist S, Tanimoto H (2011) Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J Neurosci* 31:3453–3458.
- Lasher RS, Lutz EM, Mulholland F, Sanderson R, Stewart JM, Bublitz C (1990) Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in the nucleus tractus solitarius of the rat brain. *Neuroscience Letters* 117:43–49.
- 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 USA* 108:13794–13799.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-Linking of Cell Surface Amyloid Precursor Protein Leads to Increased β -Amyloid Peptide Production in Hippocampal Neurons: Implications for Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Leulier F, Lemaitre B (2008) Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 9:165–178.
- Leuschner PJF, Obernosterer G, Martinez J (2005) MicroRNAs: Loquacious Speaks out. *Curr Biol* 15:R603–R605.
- Li Y, Hoxha V, Lama C, Dinh BH, Vo CN, Dauwalder B (2011) The hector G-Protein Coupled Receptor Is Required in a Subset of fruitless Neurons for Male Courtship Behavior. *PLoS ONE* 6:e28269–10.
- 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.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human Amyloid Precursor Protein Ameliorates Behavioral Deficit of Flies Deleted for *Appl* Gene. *Neuron* 9:595–605.
- Ma J, Ptashne M (1987) The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50:137–142.

- Marin EC, Jefferis GSXE, Komiyama T, Zhu H, Luo L (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109:243–255.
- Martin-Morris LE, White K (1990) The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* 110:185–195.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765–1768.
- Meilandt WJ, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito LA, Searce-Levie K, Cheng IH, Yu GQ, Mucke L (2009) Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J Neurosci* 29:1977–1986.
- Merdes G, Soba P, Loewer A, Bilic MV, Beyreuther K, Paro R (2004) Interference of human and *Drosophila* APP and APP-like proteins with PNS development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* 23:4082–4095.
- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH (2005) PDF Receptor Signaling in *Drosophila* Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. *Neuron* 48:213–219.
- Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A (2009) Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer* 8:128–12.
- Moretti C, Mencacci C, Frajese GV, Cerilli M, Frajese G (2002) Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13:428–435.
- Murthy M, Fiete I, Laurent G (2008) Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 59:1009–1023.
- Müller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393–406.
- Müller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006288.
- Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ (2012a) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 120 Suppl 1:167–185.
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012b) The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Neprilysin: Can We Control It? *Int J Alzheimers Dis* 2012.

- Nalivaeva NN, Turner AJ (2013) The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters* 587:2046–2054.
- Neve RL, McPhie DL, Chen YH (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Nichols CD (2006) *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics* 112:677–700.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204.
- Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I (1995) Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem* 270:4205–4208.
- Panz M, Vitos-Faleato J, Jendretzki A, Heinisch JJ, Paululat A, Meyer H (2012) A novel role for the noncatalytic intracellular domain of Neprilysins in muscle physiology. *Biol Cell* 104:553–568.
- Pardossi-Piquard R, Checler F (2011) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120:109–124.
- Pascual A, Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004) A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117:83–94.
- Pitman JL, Huetteroth W, Burke CJ, Krashes MJ, 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.
- Plaçais P-Y, de Treder É, Scheunemann L, Trannoy S, Goguel V, Han K-A, Isabel G, Preat T (2017) Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nat Comms* 8:15510.
- Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, Mohajeri MH (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A β -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis* 24:475–483.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A (2015) The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience* 307:26–36.
- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O (2011) Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819–830.

- Qiu Y, Davis RL (1993) Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes & development* 7:1447–1458.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:708–712.
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* 277:212–214.
- Ramoya P, Benton R (2010) Evolving olfactory systems on the fly. *Trends Genet* 26:307–316.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczerzak E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F, Kojro E (2011) Neuropeptide pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *The FASEB Journal* 25:3208–3218.
- Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M (2017) Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res* 14:1–1.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 11:1114–1125.
- Robinson SR, Bishop GM (2002) A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:1051–1072.
- Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolaños JP (2013) Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: Role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochemistry International* 62:750–756.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a Conserved Metalloprotease-Disintegrin Protein with Two Roles in *Drosophila* Neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo L, White K (1989) A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2478–2482.
- Saito S, Ihara M (2014) New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci* 6.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434–439.
- Sample V, Mehta S, Zhang J (2014) Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of cell science* 127:1151–1160.
- San Martín A, Ceballo S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y,

- Alegría K, Barros LF (2014) Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS ONE* 9:e85780.
- Sarantseva S, Timoshenko S, Bolshakova O, Karaseva E, Rodin D, Schwarzman AL, Vitek MP (2009) Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 4:e8191.
- Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M (2012) BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 414:171–178.
- Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Séjourné J, Plaçais P-Y, Aso Y, Siwanowicz I, Trannoy S, Thoma V, Tedjakumala SR, Rubin GM, 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.
- Sitnik JL, Francis C, Hens K, Huybrechts R, Wolfner MF, Callaerts P (2014) Neprilysins: An Evolutionarily Conserved Family of Metalloproteases That Play Important Roles in Reproduction in *Drosophila*. *Genetics* 196:781–797.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL (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.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The *Drosophila* Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562–13.
- Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, Patrick C, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2008) Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular A β and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:109–112.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170–175.
- Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218:341–347.
- Stahl R, Schilling S, Soba P, Rupp C, Hartmann T, Wagner K, Merdes G, Eggert S, Kins S (2014) Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front Cell Neurosci* 8:410.
- Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Stozická Z, Zilka N, Novák M (2007) Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol* 51:205–222.
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13:1852–1861.
- Sutcliffe B, Forero MG, Zhu B, Robinson IM, Hidalgo A (2013) Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *PLoS ONE* 8:e75902–e75915.
- Tampellini D, Rahman N, Lin MT, Capetillo-Zarate E, Gouras GK (2011) Impaired β -Amyloid Secretion in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Neurosci* 31:15384–15390.
- Tamura T, Chiang A-S, Ito N, Liu H-P, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M (2003) Aging specifically impairs amnesiac-dependent memory in *Drosophila*. *Neuron* 40:1003–1011.
- Tanaka NK, Tanimoto H, Ito K (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* 508:711–755.
- Tanzi RE, Bertram L (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181–184.
- Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, Bland ND (2005) *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function. *Biochem J* 386:357–366.
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* 6:875–U113.
- Tonoki A, Davis RL (2012) Aging impairs intermediate-term behavioral memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6319–6324.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K (1999a) Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9:489–493.
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the *Drosophila* Member of the APP-Family, Exhibits Differential Trafficking and Processing in CNS Neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999b) The *Drosophila* β -amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.
- Tudorache IF, Trusca VG, Gafencu AV (2017) Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. *Comput*

- Struct Biotechnol J 15:359–365.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical-Conditioning and Retention in Normal and Mutant *Drosophila-Melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157:263–277.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261–269.
- Turrel O, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2016) *Drosophila* Neprilysins Are Involved in Middle-Term and Long-Term Memory. *J Neurosci* 36:9535–9546.
- van der Voet M, Nijhof B, Oortveld MAW, Schenck A (2014) *Drosophila* models of early onset cognitive disorders and their clinical applications. *Neurosci Biobehav Rev* 46:326–342.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102:147–159.
- Wachowiak M, Knöpfel T (2009) Optical Imaging of Brain Activity In Vivo Using Genetically Encoded Probes. In: *In Vivo Imaging of Brain Function*, 2nd ed. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG (2000) The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103:805–813.
- Waddell S, Quinn WG (2001) What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet* 17:719–726.
- Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S (2007) Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 28:1713–1719.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretzschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wu C-L, Shih M-FM, Lai JS-Y, Yang H-T, Turner GC, 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.
- Wu C-L, Shih M-FM, 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.
- Yamamoto S, Schulze KL, Bellen HJ (2014) Introduction to Notch Signaling. In: *Notch Signaling*, pp 1–14 *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.
- Yamashima T (2013) Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain–cathepsin

- hypothesis'—A perspective review. *Prog Neurobiol* 105:1–23.
- Yamashima T (2016) Can “calpain-cathepsin hypothesis” explain Alzheimer neuronal death? *Ageing Research Reviews* 32:169–179.
- Yang C-H, Shih M-FM, Chang C-C, Chiang M-H, Shih H-W, Tsai Y-L, Chiang A-S, Fu T-F, Wu C-L (2016) Additive Expression of Consolidated Memory through *Drosophila* Mushroom Body Subsets. *PLoS Genet* 12:e1006061.
- Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K (1995) Subdivision of the *Drosophila* Mushroom Bodies by Enhancer-Trap Expression Patterns. *Neuron* 15:45–54.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919:115–121.
- Yin JC, Wallach JS, Wilder EL, Klingensmith J, Dang D, Perrimon N, Zhou H, Tully T, Quinn WG (1995) A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol Cell Biol* 15:5123–5130.
- Yu D, Akalal D-BG, 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.
- Yu D, Keene AC, Srivatsan A, Waddell S, Davis RL (2005) *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123:945–957.
- Yu D, Ponomarev A, Davis RL (2004) Altered Representation of the Spatial Code for Odors after Olfactory Classical Conditioning: Memory Trace Formation by Synaptic Recruitment. *Neuron* 42:437–449.
- Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY (2005) Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437:569–573.
- Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14997–15002.
- Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegeneration* 1:5.
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegeneration* 6.
- Zhou L, Wei C, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang R, Wang D-S (2013) Distinct subcellular patterns of neprilysin protein and activity in the brains of Alzheimer's disease patients, transgenic mice and cultured human neuronal cells. *Am J Transl Res* 5:608–621.
- Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21:1369–1377.

Figures

Figure 1 (1 column)

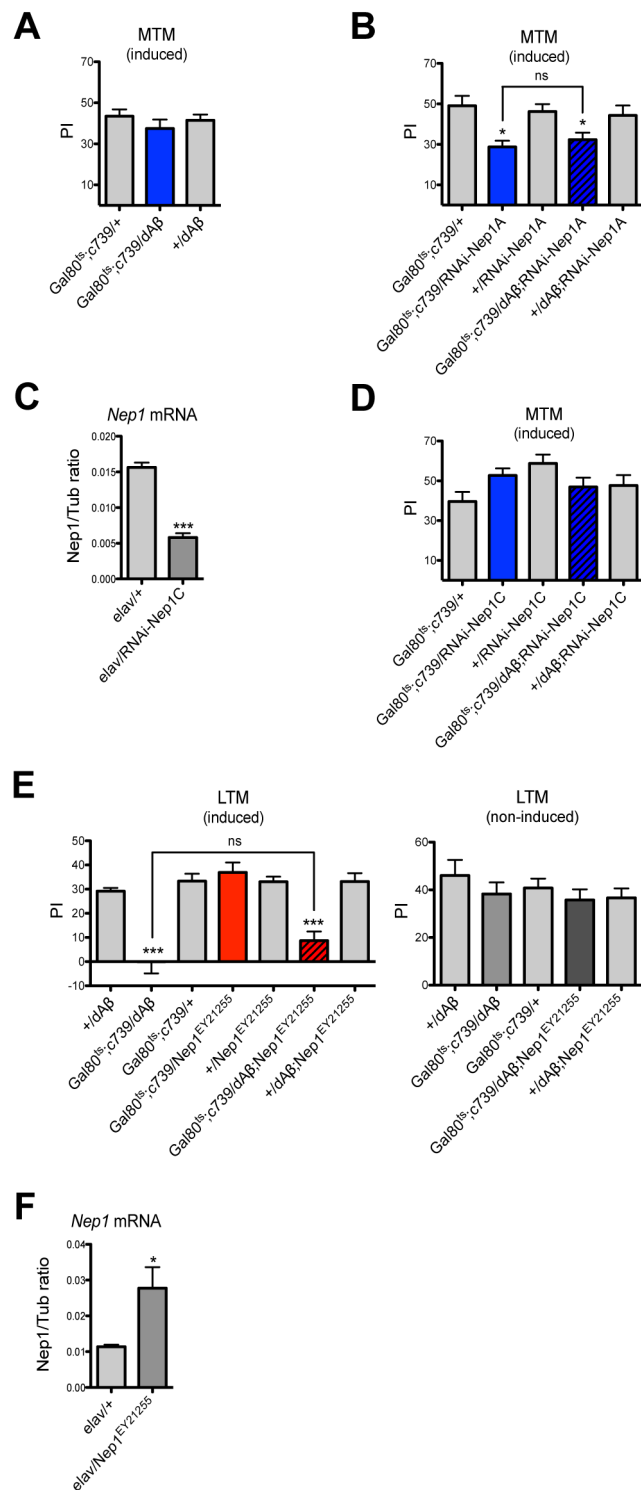


Figure 1. Modulation of Nep1 expression in the adult MB does not impact memory of flies expressing dAb.

A, dA β expression in α/β neurons does not alter MTM ($F_{(2,35)} = 0.7471$, $p = 0.4816$, $n = 12$).

B, dA β expression in α/β neurons does not aggravate the MTM defect caused by RNAi-Nep1A expression. *Gal80^{ts};c739/dA β ;RNAi-Nep1A* flies exhibit a MTM deficit that is not significantly different from that of *Gal80^{ts};c739/RNAi-Nep1A* flies ($F_{(4,69)} = 5.086$, $p = 0.0013$, $n \geq 14$, *post hoc* Newman-Keuls test, *Gal80^{ts};c739/RNAi-Nep1A* vs *Gal80^{ts};c739/+* $^{**}p < 0.01$, *Gal80^{ts};c739/RNAi-Nep1A* vs *+ /RNAi-Nep1A* $^{*}p < 0.05$, *Gal80^{ts};c739/RNAi-Nep1A* vs *Gal80^{ts};c739/dA β ;RNAi-Nep1A* $p > 0.05$).

C, qPCR analysis of *Nep1* mRNA targeting by the RNAi-Nep1C construct. Total RNA was extracted from *elav/+* and *elav/RNAi-Nep1C* fly heads, and further reverse-transcribed with oligo(dT) primers. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results are shown as ratios to the reference (Unpaired *t*-test, $t_6 = 11.07$, $^{***}p < 0.0001$, $n = 4$ [4 values from 2 independent RNA extractions]).

D, dA β expression in α/β neurons does not alter MTM of RNAi-Nep1C expressing flies. *Gal80^{ts};c739/RNAi-Nep1C* and *Gal80^{ts};c739/dA β ;RNAi-Nep1C* show normal MTM ($F_{(4,71)} = 2.354$, $p = 0.0626$, $n \geq 14$).

E, Flies expressing dA β in the α/β neurons present an LTM deficit that is not exacerbated by Nep1 overexpression. *Gal80^{ts};c739/dA β* flies exhibit an LTM deficit ($F_{(6,83)} = 17.86$, $p < 0.0001$, $n = 12$, *post hoc* Newman-Keuls test, *Gal80^{ts};c739/dA β* vs *Gal80^{ts};c739/+* $^{***}p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/dA β* vs *+ /dA β* $^{***}p < 0.001$). Flies overexpressing Nep1 in the α/β neurons show normal LTM (*Gal80^{ts};c739/Nep1^{EY21255}* vs *Gal80^{ts};c739/+* $p > 0.05$, *Gal80^{ts};c739/Nep1^{EY21255}* vs *+ /Nep1^{EY21255}* $p > 0.05$). *Gal80^{ts};c739/dA β ;Nep1^{EY21255}* flies show a LTM deficit similar to that of *Gal80^{ts};VT64246/dA β* (*Gal80^{ts};c739/dA β ;Nep1^{EY21255}* vs *Gal80^{ts};c739/+* $^{***}p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/dA β ;Nep1^{EY21255}* vs *+ /dA β ;Nep1^{EY21255}* $^{***}p < 0.001$, *Gal80^{ts};c739/dA β* vs *Gal80^{ts};c739/dA β ;Nep1^{EY21255}* $p > 0.05$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(4,59)} = 0.7078$, $p = 0.5901$, $n = 12$).

Figure 2 (2 columns)

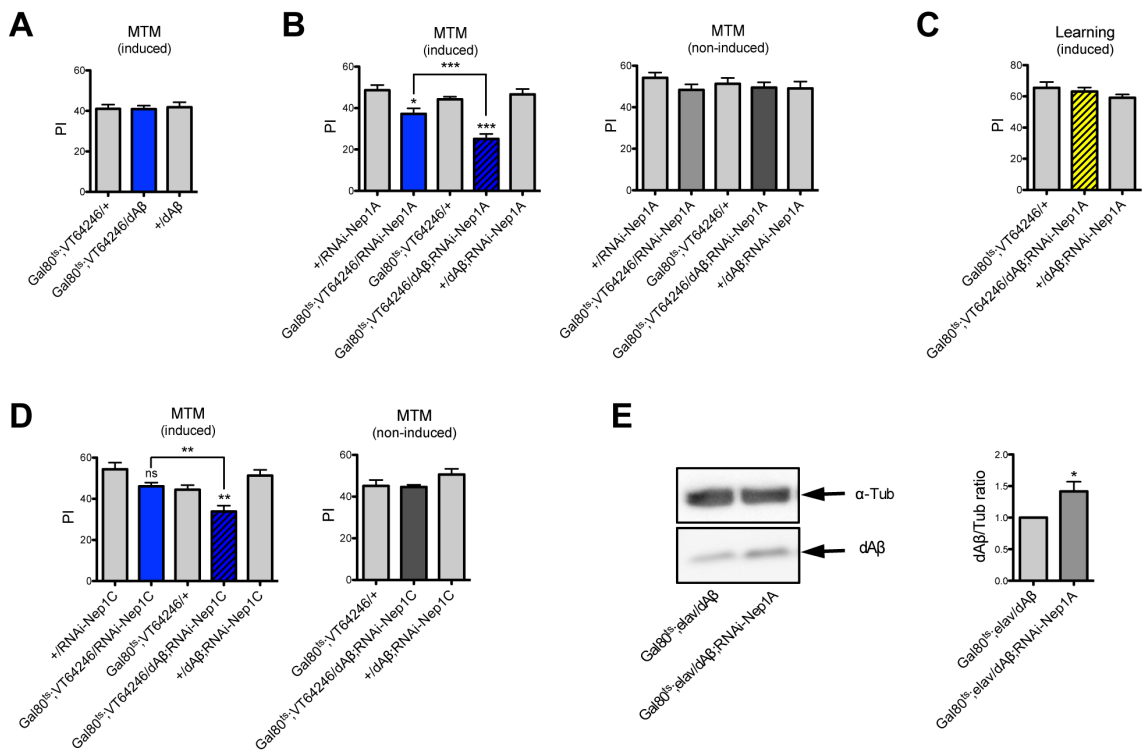


Figure 2. dAβ expression is detrimental to MTM formation when combined with Nep1 knockdown in adult DPM neurons.

A, Flies expressing dA β in DPM neurons show normal MTM ($F_{(2,32)} = 0.0550$, $p = 0.9466$, $n = 11$). **B**, Nep1 knockdown in dA β -expressing flies exacerbates their MTM deficit. *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A* flies exhibit a MTM deficit ($F_{(4,69)} = 17.62$, $p < 0.0001$, $n \geq 13$, *post hoc* Newman-Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $*p < 0.05$, *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A* vs *+ /RNAi-Nep1A* $**p < 0.01$) that is aggravated by concomitant expression of dA β (*Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $***p < 0.001$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1A* vs *+ /dA β ;RNAi-Nep1A* $***p < 0.001$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A* $***p < 0.001$). In absence of induction, all genotypes exhibit normal MTM scores ($F_{(4,54)} = 0.6991$, $p = 0.5962$, $n = 11$). **C**, Learning is not affected by dA β expression and concomitant Nep1 knockdown in DPM neurons ($F_{(2,23)} = 1.251$, $p = 0.3066$, $n = 8$). **D**, Flies expressing RNAi-Nep1C do not exhibit a MTM deficit ($F_{(4,80)} = 8.951$, $p < 0.0001$, $n \geq 16$). In contrast, RNAi-Nep1C co-expression with dA β in DPM neurons induces a MTM deficit (*Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1C* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1C* vs *+ /dA β ;RNAi-Nep1C* $***p < 0.001$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;RNAi-Nep1C* vs *Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1C* $**p < 0.01$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal MTM scores ($F_{(3,66)} = 3.655$, $p = 0.0170$, $n = 17$). **E**, dA β level is increased when Nep1 is knocked down. Western blot analyses. Left, membranes were cut in two halves: the upper part was stained using an α -Tub antibody, and the lower part was stained using an HA-specific antibody. Right, quantification. dA β is expressed as a ratio to α -Tub, relative to the *Gal80^{ts};elav/dA β* control. (One sample *t*-test, $t_7 = 2.712$, $p = 0.0301$, $n = 8$ [8 values from 8 independent extractions]). The error bar indicates SEM.

Figure 3 (2 columns)

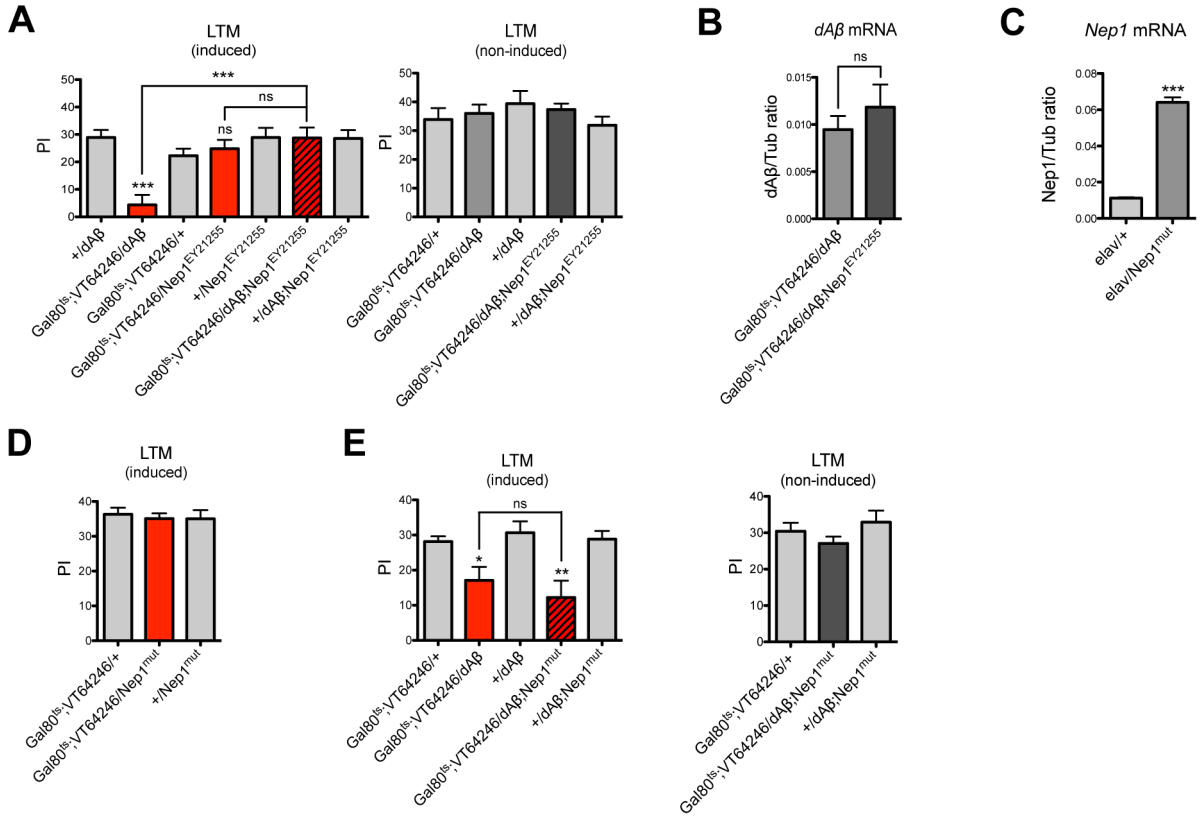


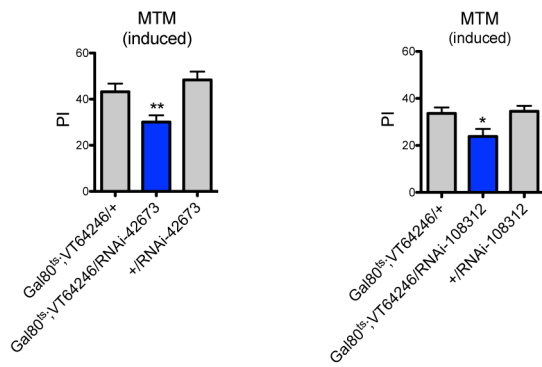
Figure 3. Nep1 overexpression in adult DPM neurons rescues the LTM defect caused by dAβ expression.

A, Nep1 overexpression in DPM neurons rescues the LTM deficit of dAβ-expressing flies. Flies expressing dAβ in DPM neurons exhibit a strong LTM defect ($F_{(6,74)} = 7.606$, $p < 0.0001$, $n \geq 10$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/dA\beta$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ *** $p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dA\beta$ vs $+/dA\beta$ *** $p < 0.001$), whereas flies overexpressing Nep1 have normal LTM ($Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}$ vs $+/Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$). $Gal80^{ts};VT64246/dA\beta;Nep1^{EY21255}$ exhibit wild-type LTM ($Gal80^{ts};VT64246/dA\beta;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dA\beta;Nep1^{EY21255}$ vs $+/dA\beta;Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dA\beta;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(6,73)} = 0.6718$, $p = 0.6727$, $n \geq 10$).

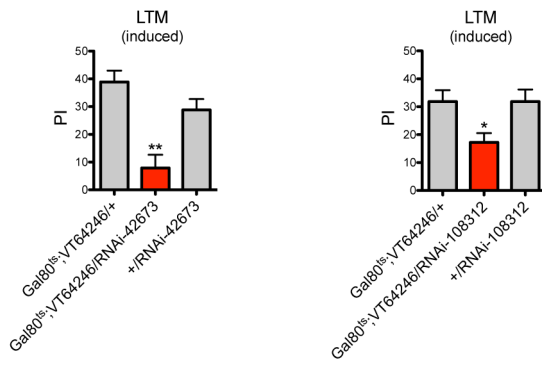
B, dA β expression is not decreased by Nep1^{EY21255} presence. qPCR analyses of dA β mRNA levels. Total RNA was extracted from *Gal80^{ts};VT64246/dA β* and *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;Nep1^{EY21255}* fly heads after induction, and further reverse-transcribed with oligo(dT) primers. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results are shown as ratios to the reference (Unpaired *t*-test, $t_7 = 4.098$, $p = 0.0658$, $n = 8$ [8 values from 4 independent RNA extractions]). **C**, Flies overexpressing Nep1^{mut}, a mutant inactive Nep1 form, in DPM neurons, show normal LTM ($F_{(2,35)} = 0.1371$, $p = 0.8724$, $n = 12$). **D**, Nep1^{mut} expression does not rescue the LTM deficit caused by dA β ($F_{(4,109)} = 6.035$, $p = 0.0002$, $n = 22$, *post hoc* Newman-Keuls test, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;Nep1^{mut}* vs *Gal80^{ts};VT64246/+* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;Nep1^{mut}* vs *+/dA β ;Nep1^{mut}* $**p < 0.01$, *Gal80^{ts};VT64246/dA β ;Nep1^{mut}* vs *Gal80^{ts};VT64246/dA β* $p > 0.05$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(4,59)} = 1.575$, $p = 0.1939$, $n = 12$).

Figure 4 (1 column)

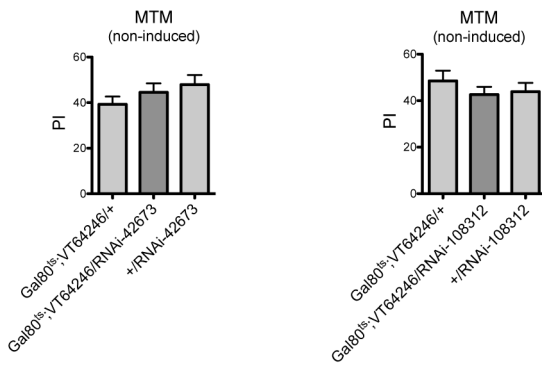
A



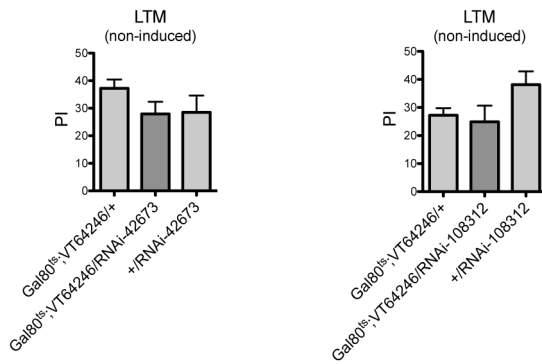
B



C



D



E

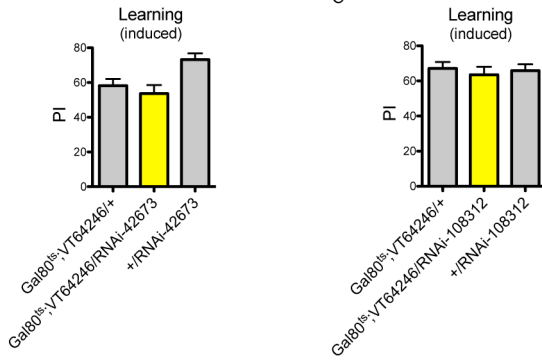


Figure 4. APPL expression is required in adult DPM neurons for MTM and LTM.

A, Flies expressing APPL-RNAi in adult DPM neurons present MTM defects (RNAi-42673: $F_{(2,41)} = 7.990$, $p = 0.0012$, $n = 14$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $**p < 0.01$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $+/RNAi-42673$ $**p < 0.01$; RNAi-108312: $F_{(2,37)} = 4.657$, $p = 0.0161$, $n \geq 12$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $*p < 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312$ vs $+/RNAi-108312$ $*p < 0.05$). **B,** Flies expressing APPL-RNAi in adult DPM neurons present LTM defects (RNAi-42673: $F_{(2,46)} = 13.85$, $p < 0.0001$, $n \geq 15$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $+/RNAi-42673$ $**p < 0.01$; RNAi-108312: $F_{(2,63)} = 4.530$, $p = 0.0146$, $n \geq 21$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $*p < 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312$ vs $+/RNAi-108312$ $*p < 0.05$). **C,** In the absence of induction, all genotypes exhibit normal MTM scores (RNAi-42673: $F_{(2,29)} = 1.250$, $p = 0.3025$, $n = 10$; RNAi-108312: $F_{(2,23)} = 0.6399$, $p = 0.5373$, $n = 8$). **D,** In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores (RNAi-42673: $F_{(2,57)} = 1.213$, $p = 0.3051$, $n \geq 19$; RNAi-108312: $F_{(2,59)} = 2.506$, $p = 0.0905$, $n \geq 19$). **E,** Learning is not affected APPL-RNAi expression in adult DPM neurons (RNAi-42673: $F_{(2,23)} = 6.108$, $p = 0.0081$, $n = 8$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673$ vs $+/RNAi-42673$ $**p < 0.01$; RNAi-108312: $F_{(2,23)} = 0.6399$, $p = 0.5373$, $n = 8$).

Figure 5 (1 column)

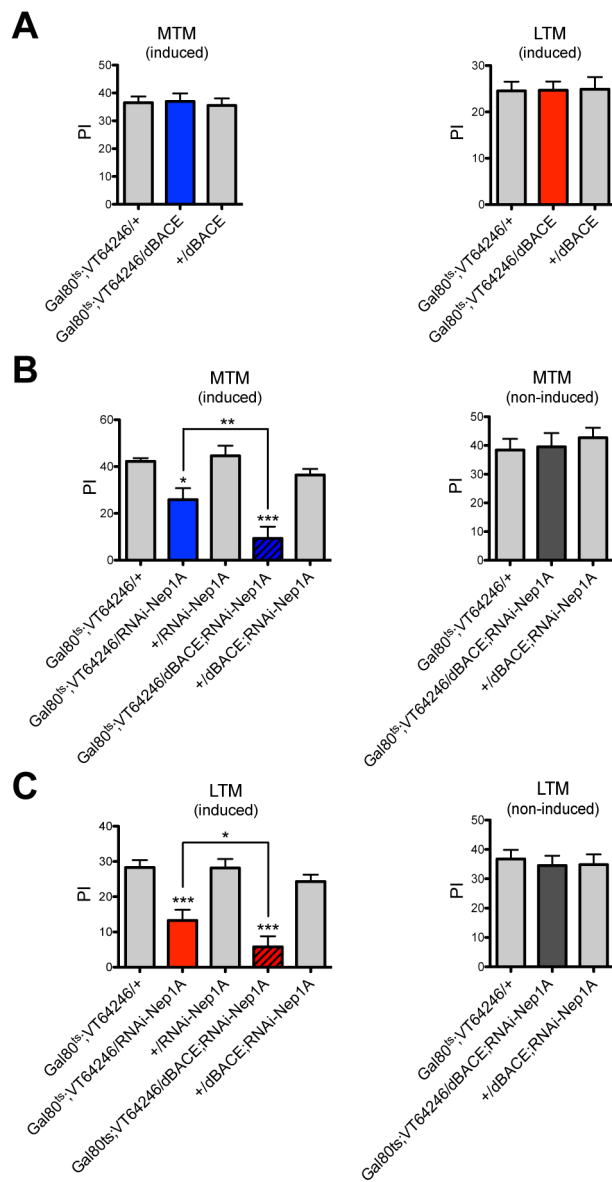


Figure 5. dBACE overexpression aggravates MTM and LTM defects caused by Nep1 knockdown in adult DPM neurons.

A, dBACE overexpression in DPM neurons does not alter MTM ($F_{(2,35)} = 0.0788$, $p = 0.9244$, $n = 12$) or LTM ($F_{(2,36)} = 0.0072$, $p = 0.9928$, $n \geq 11$). **B**, dBACE overexpression in DPM neurons exacerbates the MTM deficit cause by Nep1 knockdown ($F_{(4,42)} = 14.39$, $p < 0.0001$, $n \geq 8$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $*p < 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ vs $+/RNAi-Nep1A$ $*p < 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $+/dBACE;RNAi-Nep1A$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ $**p < 0.01$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal MTM scores ($F_{(4,49)} = 0.3999$, $p = 0.8077$, $n = 10$). **C**, dBACE overexpression in DPM neurons exacerbates the LTM deficit cause by Nep1 knockdown ($F_{(4,66)} = 15.06$, $p < 0.0001$, $n \geq 13$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ vs $+/RNAi-Nep1A$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $+/dBACE;RNAi-Nep1A$ $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/RNAi-Nep1A$ $*p < 0.05$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(4,51)} = 0.1327$, $p = 0.9696$, $n \geq 10$).

Figure 6 (1,5 column)

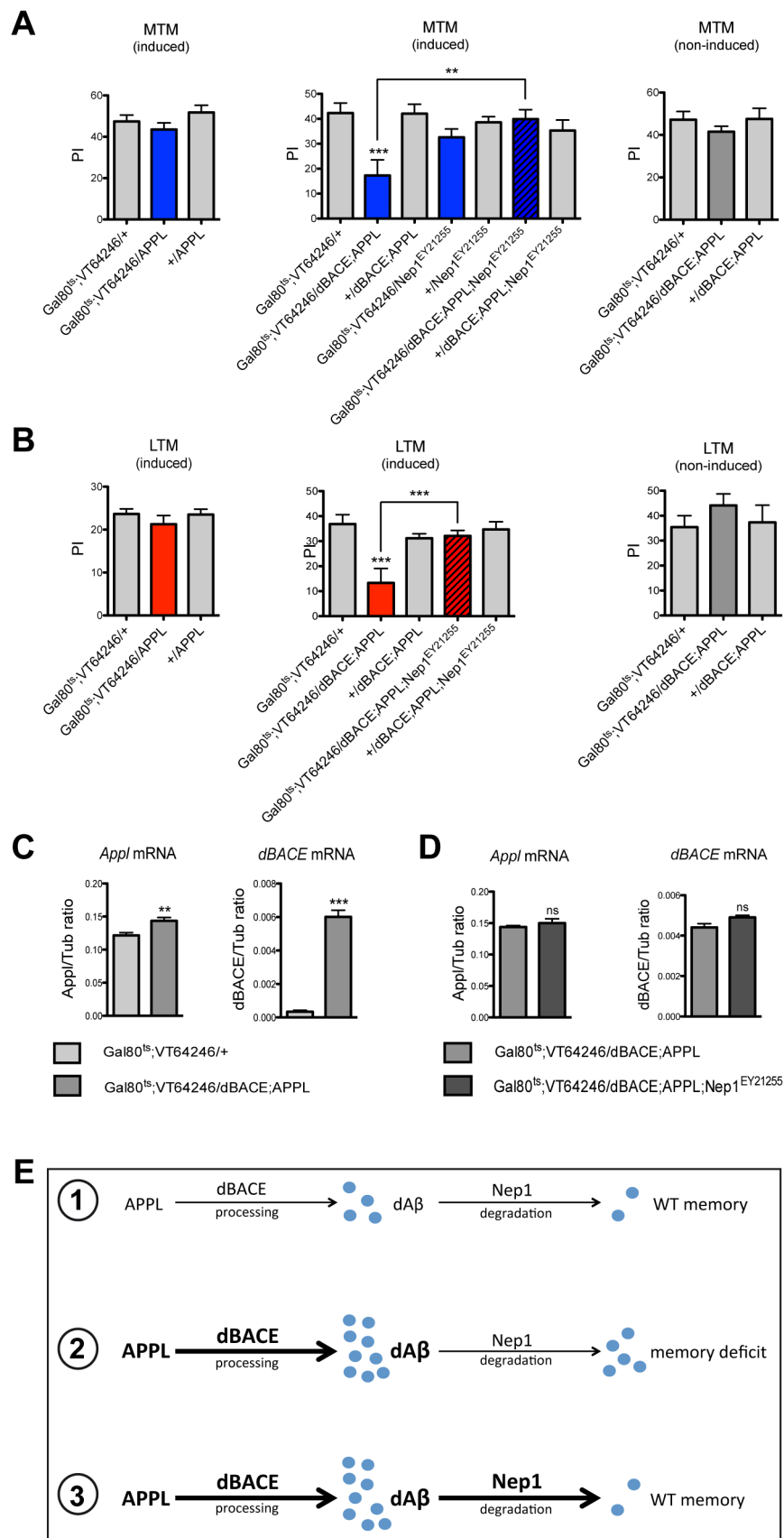


Figure 6. Nep1 overexpression rescues the memory deficit caused by APPL and dBACE co-expression in adult DPM neurons.

A, Nep1 overexpression rescues the MTM deficit caused by APPL and dBACE co-expression in adult DPM neurons. APPL overexpression in DPM neurons does not alter MTM ($F_{(2,35)} = 1.575$, $p = 0.2222$, $n = 12$). Flies co-expressing APPL and dBACE in DPM neurons present a MTM defect ($F_{(6,70)} = 4.559$, $p = 0.0007$, $n \geq 10$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ *** $p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ vs $+/dBACE;APPL$ *** $p < 0.001$), whereas flies overexpressing Nep1 exhibit normal MTM ($Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/Nep1^{EY21255}$ vs $+/Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$). Flies co-expressing dBACE, APPL and Nep1 present wild-type MTM ($Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $+/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ ** $p < 0.01$). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal MTM scores ($F_{(2,29)} = 0.7477$, $p = 0.4830$, $n = 10$).

B, Nep1 overexpression rescues the LTM deficit caused by APPL and dBACE co-expression in adult DPM neurons. APPL overexpression in DPM neurons does not alter LTM ($F_{(2,23)} = 0.7440$, $p = 0.4873$, $n = 8$). Flies co-expressing APPL and dBACE in DPM neurons present a LTM defect ($F_{(6,69)} = 7.299$, $p < 0.0001$, $n = 10$, *post hoc* Newman-Keuls test, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ *** $p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ vs $+/dBACE;APPL$ *** $p < 0.001$), whereas flies co-expressing dBACE, APPL and Nep1 present wild-type LTM ($Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $+/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ $p > 0.05$, $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL$ *** $p < 0.001$).

0.001). In the absence of induction, all genotypes exhibit normal LTM scores ($F_{(2,29)} = 0.6927$, $p = 0.5089$, $n = 10$). **C**, **D**, qPCR experiments. Total RNA was extracted from *Gal80^{ts};VT64246/+*, *Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL* and *Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL;Nep1^{EY21255}* fly heads after induction, and further reverse-transcribed with oligo(dT) primers. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results are shown as ratios to the reference. **C**, Analysis of APPL and dBACE overexpression driven by *Gal80^{ts};VT64246* (*Appl*: Unpaired *t*-test, $t_{18} = 3.328$, $**p = 0.0037$, $n = 10$ [10 values from 5 independent RNA extractions]; *dBACE*: Unpaired *t*-test, $t_{10} = 13.83$, $***p < 0.0001$, $n = 6$ [6 values from 3 independent RNA extractions]). **D**, *Appl* and *dBACE* mRNA expression are not modified by the presence of *Nep1^{EY21255}*. (*Appl*: Unpaired *t*-test, $t_{10} = 0.08343$, $p = 0.4236$, $n = 6$ [6 values from 3 independent RNA extractions]; *dBACE*: Unpaired *t*-test, $t_6 = 2.319$, $p = 0.0595$, $n = 4$ [4 values from 2 independent RNA extractions]). **E**, Schematic interpretation. 1) In a wild type context, dA β is degraded by Nep1 to ensure wild type memory. 2) APPL and dBACE co-overexpression leads to an increased level of dA β that is detrimental to memory formation. 3) The memory defect caused by dA β overproduction is overcome by an increase in its degradation by Nep1. Blue circles depict dA β .

Tables

Table 1. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing dA β in adult α/β neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};c739/+</i>	71.89 $\pm$ 4.101	44.18 $\pm$ 6.630	55.58 $\pm$ 8.198
<i>Gal80^{ts};c739/dAβ</i>	68.56 $\pm$ 2.799	36.45 $\pm$ 6.742	49.25 $\pm$ 7.248
<i>+/dAβ</i>	63.11 $\pm$ 3.405	37.00 $\pm$ 6.520	45.27 $\pm$ 10.54

Data are shown as means $\pm$ SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(2,26)} = 1.625$, $p = 0.2179$, $n = 9$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(2,32)} = 0.4229$, $p = 0.6590$, $n = 11$) and methylcyclohexanol ($F_{(2,34)} = 0.3573$, $p = 0.7,24$, $n \geq 11$) is impaired in flies expressing dA β under the control of the *Gal80^{ts};c739* driver.

Table 2. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing dA β and Nep1-RNAi in adult DPM neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	66.20 $\pm$ 3.133	38.40 $\pm$ 1.485	52.80 $\pm$ 7.513
<i>Gal80^{ts};VT64246/dAβ;RNAi-Nep1A</i>	65.00 $\pm$ 3.697	39.90 $\pm$ 2.900	57.50 $\pm$ 2.655
<i>+/dAβ;RNAi-Nep1A</i>	70.40 $\pm$ 3.246	36.20 $\pm$ 1.825	56.00 $\pm$ 5.914
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	63.50 $\pm$ 4.856	50.60 $\pm$ 3.387	51.00 $\pm$ 2.039
<i>Gal80^{ts};VT64246/dAβ;RNAi-Nep1C</i>	64.00 $\pm$ 5.510	54.10 $\pm$ 2.938	59.30 $\pm$ 5.281
<i>+/dAβ;RNAi-Nep1C</i>	55.80 $\pm$ 4.299	55.30 $\pm$ 4.828	49.10 $\pm$ 2.433

Data are shown as means $\pm$ SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity (dA β ;RNAi-Nep1A: $F_{(2,29)} = 0.7089$, $p = 0.5011$, $n = 10$; dA β ;RNAi-Nep1C: $F_{(2,29)} = 0.8753$, $p = 0.4282$, $n = 10$) nor olfactory acuity for octanol (dA β ;RNAi-Nep1A: $F_{(2,29)} = 0.7452$, $p = 0.4842$, $n = 10$; dA β ;RNAi-Nep1C: $F_{(2,29)} = 0.4121$, $p = 0.6664$, $n = 10$) and methylcyclohexanol (dA β ;RNAi-Nep1A: $F_{(2,29)} = 0.1756$, $p = 0.8399$, $n = 10$; dA β ;RNAi-Nep1C: $F_{(2,29)} = 2.325$, $p = 0.1171$, $n = 10$) is impaired in flies expressing dA β and Nep1 RNAi under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver.

Table 3. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing dA β in adult DPM neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	71.70 $\pm$ 3.422	50.80 $\pm$ 5.092	56.20 $\pm$ 6.771
<i>Gal80^{ts};VT64246/dAβ</i>	63.90 $\pm$ 3.121	47.70 $\pm$ 6.035	49.90 $\pm$ 5.023
<i>+/dAβ</i>	59.00 $\pm$ 4.683	48.70 $\pm$ 7.030	56.30 $\pm$ 4.522

Data are shown as means $\pm$ SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(2,29)} = 2.836$, $p = 0.0762$, $n = 10$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(2,29)} = 0.0672$, $p = 0.9352$, $n = 10$) and methylcyclohexanol ($F_{(2,29)} = 0.4407$, $p = 0.6481$, $n = 10$) is impaired in flies expressing dA β under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver.

Table 4. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing APPL-RNAi in adult DPM neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	73.92 $\pm$ 5.447	55.80 $\pm$ 5.557	47.80 $\pm$ 5.142
<i>Gal80^{ts};VT64246/RNAi-108312</i>	84.42 $\pm$ 3.526	65.30 $\pm$ 3.652	56.10 $\pm$ 6.689
<i>+/108312</i>	75.92 $\pm$ 3.073	56.30 $\pm$ 5.365	55.50 $\pm$ 4.191
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	76.92 $\pm$ 4.853	41.25 $\pm$ 4.496	51.75 $\pm$ 4.563
<i>Gal80^{ts};VT64246/RNAi-42673</i>	66.92 $\pm$ 4.920	41.69 $\pm$ 6.970	48.08 $\pm$ 6.414
<i>+/42673</i>	74.33 $\pm$ 3.085	46.63 $\pm$ 5.507	50.17 $\pm$ 6.297

Data are shown as means $\pm$ SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity (RNAi-108312: $F_{(2,35)} = 1.809$, $p = 0.1797$, $n = 12$; RNAi-42673: $F_{(2,35)} = 1.411$, $p = 0.2581$, $n = 12$) nor olfactory acuity for octanol (RNAi-108312: $F_{(2,29)} = 1.175$, $p = 0.3242$, $n = 10$; RNAi-42673: $F_{(2,47)} = 0.2697$, $p = 0.7649$, $n = 16$) and methylcyclohexanol (RNAi-108312: $F_{(2,29)} = 0.7242$, $p = 0.4939$, $n = 10$; RNAi-42673: $F_{(2,35)} = 0.0999$, $p = 0.9052$, $n = 12$) is impaired in flies expressing APPL RNAi under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver.

Table 5. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing dBACE and RNAi-Nep1A in adult DPM neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	80.40 $\pm$ 4.425	68.80 $\pm$ 5.705	65.10 $\pm$ 4.233
<i>Gal80^{ts};VT64246/dBACE;RNAi-Nep1A</i>	78.40 $\pm$ 3.219	68.90 $\pm$ 5.248	64.00 $\pm$ 5.134
<i>+/dBACE;RNAi-Nep1A</i>	80.20 $\pm$ 4.828	65.10 $\pm$ 2.799	70.70 $\pm$ 3.448

Data are shown as means $\pm$ SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(4,47)} = 0.3371$, $p = 0.8515$, $n \geq 8$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(4,47)} = 0.3231$, $p = 0.8610$, $n \geq 8$)

and methylcyclohexanol ($F_{(4,47)} = 0.5304$, $p = 0.7140$, $n \geq 8$) is impaired in flies expressing dBACE and RNAi-Nep1A under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver.

Table 6. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing dBACE and APPL in adult DPM neurons

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};VT64246/+</i>	72.70 ± 6.756	51.20 ± 2.851	55.10 ± 1.798
<i>Gal80^{ts};VT64246/dBACE;APPL</i>	81.78 ± 5.325	57.00 ± 3.864	65.30 ± 8.215
<i>+/dBACE;APPL</i>	69.00 ± 4.415	56.70 ± 6.136	58.60 ± 5.431

Data are shown as means ± SEM. After 3 d of induction, neither shock reactivity ($F_{(2,29)} = 0.0684$, $p = 0.9341$, $n = 10$) nor olfactory acuity for octanol ($F_{(2,29)} = 0.2071$, $p = 0.8142$, $n = 10$) and methylcyclohexanol ($F_{(2,29)} = 0.6896$, $p = 0.5104$, $n = 10$) is impaired in flies expressing dBACE and APPL under the control of the *Gal80^{ts};VT64246* driver.

Résultats supplémentaires :

Dans cet article, nous avons montré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre Nep1 et les peptides dA β , endogènes et artificiels. Cette interaction a été mise en évidence lorsque ces protéines sont exprimées dans les neurones DPM, et pas lorsqu'elles sont exprimées dans les MB.

1- L'expression de peptides dA β affecte la MTM

Concernant les résultats obtenus pour le phénotype d'aggravation par l'expression de dA β , du défaut de mémoire à 2 h causé par le RNAi-Nep1, il nous a paru intéressant d'identifier la forme exacte de mémoire affectée. En effet, la mémoire à 2 h est composée pour partie de mémoire labile sensible au froid (MTM), et pour l'autre partie, de mémoire résistante au froid (MT-ARM). Pour répondre à la question, nous avons soumis les drosophiles à un choc sur glace (4°C) pendant 2 minutes, une heure avant le test mnésique. Ce choc anesthésiant permet d'effacer la mémoire labile MTM pour ne garder que la MT-ARM. Nous avons pu ainsi observer que la mémoire affectée chez les drosophiles Gal80^{ts};VT64246/dA β ;Nep1A est la MTM, car après le traitement par le froid, on n'observe pas de réduction supplémentaire de la mémoire (Figure 35).

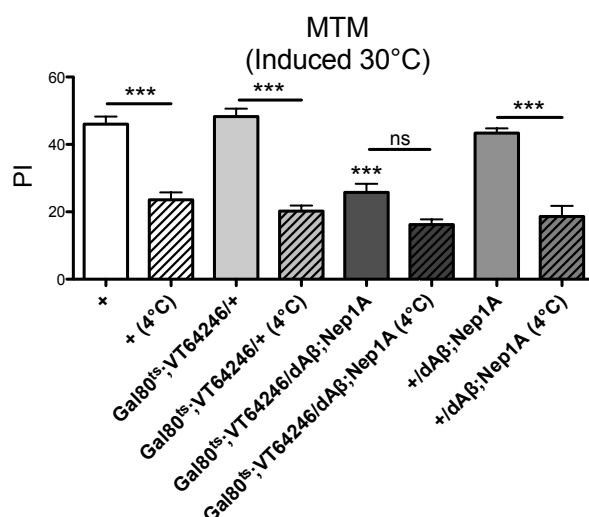


Figure 35 : La mémoire affectée par l'expression de peptides dA β dans les neurones DPM de drosophiles présentant une réduction de Nep1 est de la MTM.

Après le choc sur glace, les drosophiles $+$, $Gal80^{ts};VT64246/+$ et $+/d\Delta\beta;Nep1A$ présentent un fort défaut de MTM ($F_{(7,94)} = 32.27$, $p < 0.0001$, $n \geq 8$, test post-hoc Newman-Keuls, $+$ vs $+$ ($4^{\circ}C$) $***p < 0.001$, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/+$ ($4^{\circ}C$) $***p < 0.001$, $+/d\Delta\beta;Nep1A$ vs $+/d\Delta\beta;Nep1A$ ($4^{\circ}C$) $***p < 0.001$) alors que les drosophiles $Gal80^{ts};VT64246/d\Delta\beta;Nep1A$ ne présentent pas de réduction supplémentaire (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/d\Delta\beta;Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/d\Delta\beta;Nep1A$ ($4^{\circ}C$) $p > 0.05$).

2- La surexpression d'APPL dans les neurones DPM adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1

Nous avons montré que ni la surexpression de dBACE ni celle d'APPL dans les neurones DPM ne provoque de défaut de MTM ou de LTM. Etant donné que la surexpression de dBACE seule est suffisante pour aggraver les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1 dans les neurones DPM adultes, nous avons voulu déterminer si la surexpression d'APPL seule pouvait avoir le même effet.

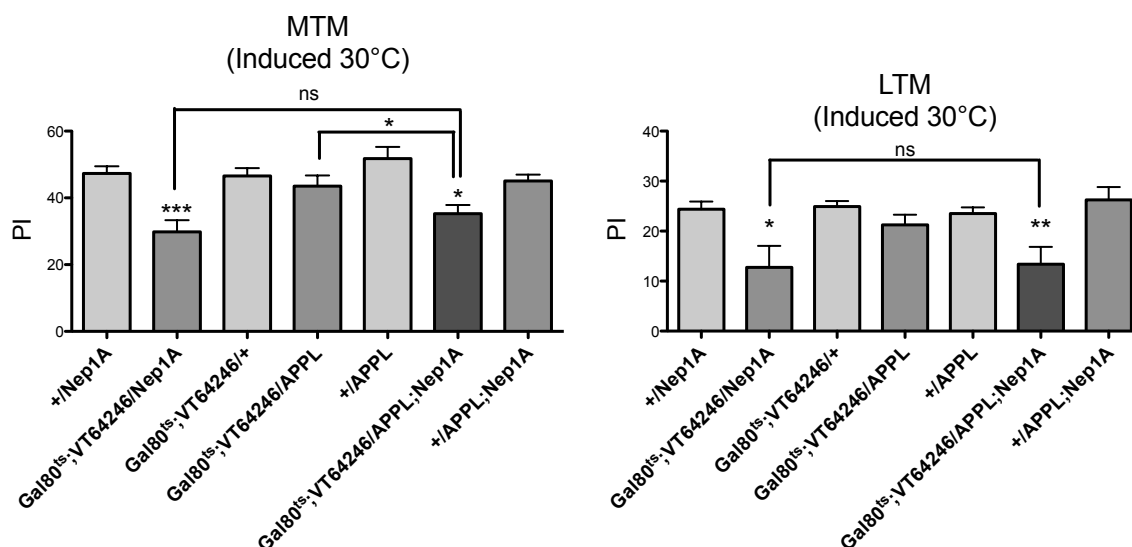


Figure 36 : La surexpression d'APPL dans les neurones DPM adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1.

A. L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les DPM adultes provoque un défaut de MTM ($F_{(6,87)} = 6.950$, $p < 0.0001$, $n \geq 12$, test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ $***p < 0.001$, $+/Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ $***p < 0.001$) contrairement à la surexpression d'APPL (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/APPL$ $p > 0.05$, $+/APPL$ vs $Gal80^{ts};VT64246/APPL$ $p > 0.05$). Les drosophiles exprimant le RNAi-Nep1 combiné avec une surexpression d'APPL présentent un défaut de MTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A$ $*p < 0.05$).

0.05, *+/APPL;Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A* **p* < 0.05) qui n'est pas différent de celui des drosophiles *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* (test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* *p* > 0.05). B. L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les DPM adultes provoque un défaut de LTM ($F_{(6,59)} = 5.100$, *p* = 0.0003, *n* ≥ 12, test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/+* vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* ***p* < 0.01, *+/Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* **p* < 0.05) contrairement à la surexpression d'APPL (test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/+* vs *Gal80^{ts};VT64246/APPL* *p* > 0.05, *+/APPL* vs *Gal80^{ts};VT64246/APPL* *p* > 0.05). Les drosophiles exprimant le RNAi-Nep1 combiné avec une surexpression d'APPL présentent un défaut de LTM (test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/+* vs *Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A* ***p* < 0.01, *+/APPL;Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A* ***p* < 0.01) qui n'est pas différent de celui des drosophiles *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* (test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/APPL;Nep1A* vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep1A* *p* > 0.05).

La surexpression d'APPL dans les neurones DPM adultes ne permet d'aggraver ni le défaut de MTM ni le défaut de LTM observés chez les drosophiles exprimant le RNAi-Nep1A (Figure 36).

BACE été décrite comme une enzyme dont l'activité est limitante pour l'expression des peptides amyloïdes (Sathya et al., 2012). De plus, dBACE semble très peu exprimée dans le cerveau des mouches adultes (FlyAtlas, <http://flyatlas.org/atlas.cgi>). Il est ainsi possible que sa surexpression cause une augmentation de la production de peptides dAβ, mais que la surexpression de son substrat, APPL, à cause d'une quantité limitante de dBACE dans les neurones DPM, ne permette pas une augmentation significative de la synthèse des peptides dAβ.

3- La surexpression de dBACE dans les neurones α/β adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1

Dans notre article, nous n'avons pu montrer l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les peptides artificiels dAβ et Nep1 que dans les neurones DPM. Pour conforter ces observations, nous avons voulu analyser si l'interaction entre dBACE et Nep1, probablement causée par une augmentation de peptides dAβ endogènes, pouvait se produire dans les MB.

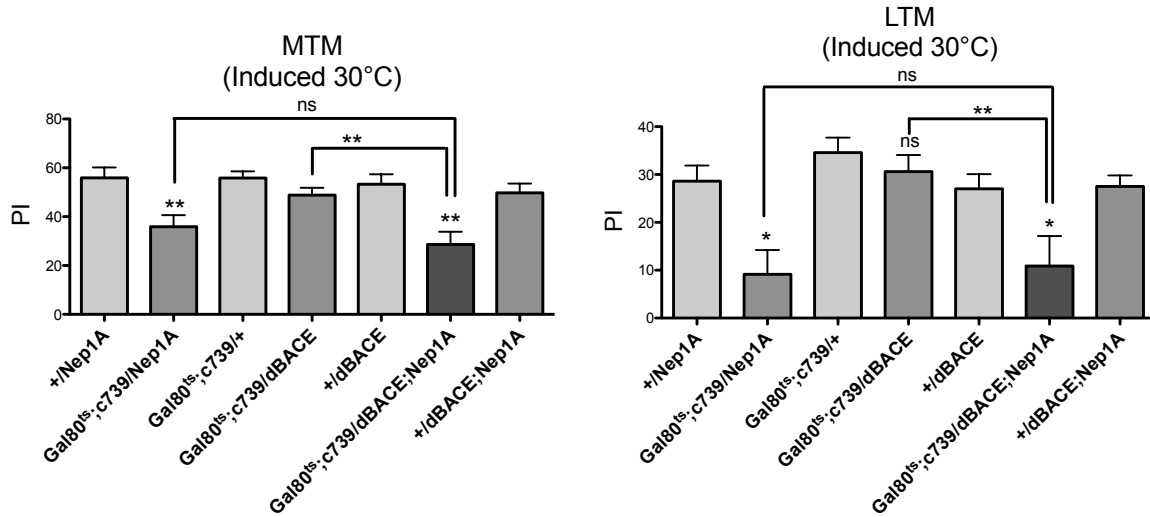


Figure 37 : La surexpression de dBACE dans les neurones α/β adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1.

A. L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les neurones α/β adultes provoque un défaut de MTM ($F_{(6,78)} = 7.113$, $p < 0.0001$, $n \geq 10$, test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $**p < 0.01$, $+Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $**p < 0.01$) alors que la surexpression de dBACE ne provoque pas de défaut de MTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE$ $p > 0.05$, $+dBACE$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE$ $p > 0.05$). Les drosophiles $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ présentent un défaut de MTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ $***p < 0.001$, $+dBACE;Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ $**p < 0.01$) qui n'est pas différent du défaut observé chez les drosophiles $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $p > 0.05$).

B. L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les neurones α/β adultes provoque un défaut de LTM ($F_{(6,58)} = 6.336$, $p < 0.0001$, $n \geq 7$, test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $***p < 0.001$, $+Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $*p < 0.05$) alors que la surexpression de dBACE ne provoque pas de défaut de LTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE$ $p > 0.05$, $+dBACE$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE$ $p > 0.05$). Les drosophiles $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ présentent un défaut de LTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/+$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ $***p < 0.001$, $+dBACE;Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ $*p < 0.05$) qui n'est pas différent du défaut observé chez les drosophiles $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};c739/dBACE;Nep1A$ vs $Gal80^{ts};c739/Nep1A$ $p > 0.05$).

Nous n'avons pas observé d'interaction entre dBACE et Nep1 lorsque l'on module leur expression dans les neurones α/β adultes: les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1 ne sont pas aggravés par la surexpression de dBACE (Figure 37).

Ces résultats sont concordants avec ceux observés dans le cadre de la surexpression de peptides dA β artificiels.

En conclusion, la Nep1 présente dans les MB ne semble pas impliquée dans une interaction fonctionnelle avec les peptides dA β , qu'ils soient artificiels ou endogènes.

4- Absence d'interaction entre Nep1 et les peptides amyloïdes humains

Deux études ont montré que Nep2 pouvait dégrader les peptides humains A β_{42} exprimés chez la drosophile (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008). Etant donné que nos expériences ont permis de révéler une interaction entre Nep1 et les peptides dA β , nous avons voulu savoir si Nep1 pouvait, tout comme Nep2, dégrader les peptides A β humains (hA β_{42}). Pour cela nous avons étudié si le défaut de MTM causé par l'inhibition de Nep1 dans les DPM adultes pouvait être aggravé par l'expression de peptides hA β_{42} .

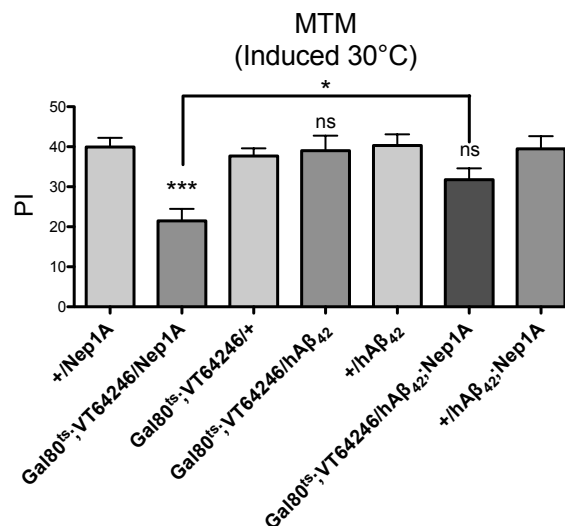


Figure 38 : L'expression de peptides hA β_{42} dans les neurones DPM adultes sauve le défaut de MTM causé par l'expression d'un RNAi-Nep1.

L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les DPM adultes provoque un défaut de MTM ($F_{(6,96)} = 5.757$, $p < 0.0001$, $n \geq 13$, test post-hoc Newman-Keuls, Gal80^{ts};VT64246/+ vs Gal80^{ts};VT64246/Nep1A *** $p < 0.001$, +/Nep1A vs Gal80^{ts};VT64246/Nep1A *** $p < 0.001$) alors que l'expression de peptides hA β_{42} ne provoque pas de défaut de MTM (test post-hoc Newman-Keuls, Gal80^{ts};VT64246/+ vs Gal80^{ts};VT64246/hA β_{42} $p > 0.05$, +/hA β_{42} vs Gal80^{ts};VT64246/hA β_{42} $p > 0.05$). Les drosophiles exprimant des peptides hA β_{42} combinés avec une diminution de Nep1 dans les DPM adultes présentent des scores de MTM normaux, qui sont supérieurs à ceux des drosophiles Gal80^{ts};VT64246/Nep1A (test post-hoc Newman-Keuls, Gal80^{ts};VT64246/hA β_{42} ;Nep1A vs Gal80^{ts};VT64246/Nep1A * $p < 0.05$).

De même que l'expression de peptides dA β , l'expression de hA β ₄₂ dans les DPM adultes ne provoque pas de défaut de MTM. L'expression de ces peptides n'aggrave pas le phénotype causé par l'inhibition de Nep1, mais au contraire, elle permet de restaurer un phénotype sauvage (Figure 38). Cela pourrait s'expliquer par une dilution du facteur de transcription Gal4 au niveau de son UAS, causée par la présence de deux transgènes, et donc de 2 UAS. Cette hypothèse pourrait être étudiée par des expériences de qPCR qui n'ont pas à ce jour été réalisées.

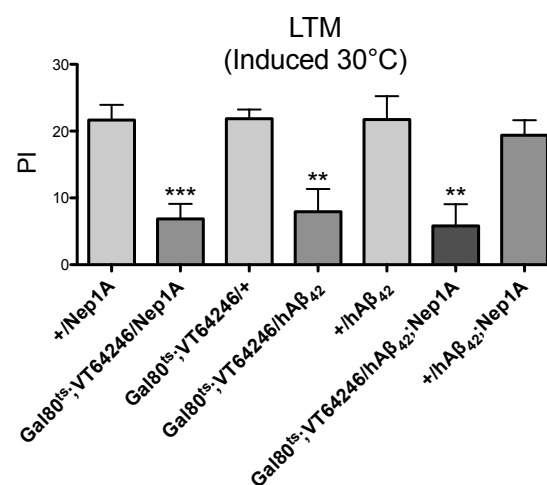


Figure 39 : L'expression de peptides hA β ₄₂ dans les DPM adultes n'aggrave pas le défaut de LTM causé par l'inhibition de Nep1.

L'expression d'un RNAi-Nep1 dans les DPM adultes provoque un défaut de LTM ($F_{(6,111)} = 8.780$, $p < 0.0001$, $n \geq 15$, test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ *** $p < 0.001$, $+/Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ *** $p < 0.001$) ainsi que l'expression de peptides hA β ₄₂ (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42}$ ** $p < 0.01$, $+/hA\beta_{42}$ vs $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42}$ ** $p < 0.01$). Les drosophiles exprimant des peptides hA β ₄₂ combinés avec une diminution de Nep1 dans les DPM adultes présentent un défaut de LTM (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/+$ vs $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42};Nep1A$ *** $p < 0.001$, $+/hA\beta_{42};Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42};Nep1A$ ** $p < 0.01$), qui est similaire à ceux des drosophiles $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42};Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/Nep1A$ $p > 0.05$) et $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42}$ (test post-hoc Newman-Keuls, $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42};Nep1A$ vs $Gal80^{ts};VT64246/hA\beta_{42}$ $p > 0.05$).

De même que la surexpression de peptides dA β , l'expression de hA β ₄₂ dans les DPM adultes provoque un défaut de LTM (Figure 39). Ce défaut étant très prononcé, il n'est probablement pas possible d'observer son aggravation. En conclusion, nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence une interaction fonctionnelle entre Nep1 et les peptides hA β ₄₂. Par conséquent, l'étude de Nep2 est requise pour les modèles de la maladie d'Alzheimer utilisant des peptides humains alors que pour l'étude de modèles plus physiologiques pour la drosophile utilisant des peptides dA β , Nep1 peut être étudiée car elle interagit spécifiquement avec les peptides amyloïdes de drosophiles.

5- L'inhibition de Nep2 et de Nep3 ne permet pas de mettre en évidence une interaction avec les peptides dA β

Nous avons également cherché à déterminer la spécificité de l'interaction entre Nep1 et dA β . Autrement dit, nous avons aussi voulu étudier si d'autres néprilysines présentaient également une interaction avec dA β . De manière similaire au protocole d'aggravation par l'expression de peptides dA β du défaut de MTM causé par l'inhibition de Nep1, nous avons utilisé des RNAi dirigés contre Nep2 et Nep3, en combinaison avec l'expression de peptides dA β . L'expression de dA β n'a pas aggravé le défaut de MTM causé par l'inhibition de Nep2 dans les DPM adultes (Figure 40).

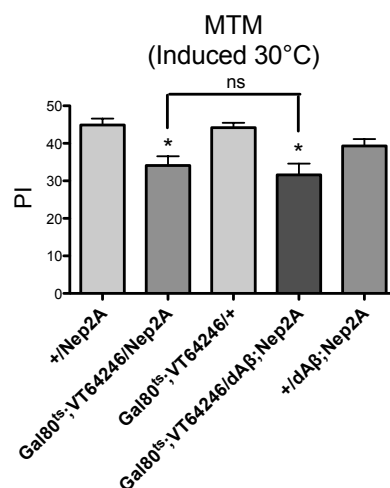


Figure 40 : L'expression de peptides dA β n'aggrave pas les défauts de MTM causés par l'expression d'un RNAi-Nep2 dans les neurones DPM adultes.

L'expression d'un RNAi-Nep2 dans les DPM adultes provoque un défaut de MTM ($F_{(4,56)} = 7.696$, $p < 0.0001$, $n \geq 9$, test post-hoc Newman-Keuls, Gal80^{ts};VT6246/+ vs Gal80^{ts};VT64246/Nep2A ** $p < 0.01$,

+Nep2A vs *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* **p* < 0.05) qui n'est pas aggravé par l'expression de peptides dAβ (test post-hoc Newman-Keuls, *Gal80^{ts};VT64246/Nep2A* vs *Gal80^{ts};VT64246/dAβ;Nep2A* *p* > 0.05).

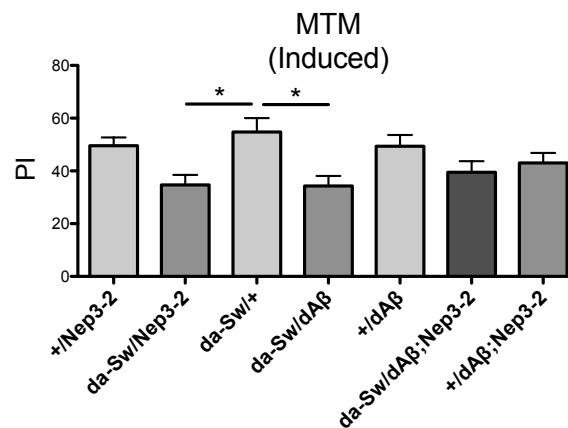


Figure 41 : L'inhibition ubiquitaire de Nep3 provoque une tendance à un défaut de MTM, de même que l'expression ubiquitaire de peptides dAβ.

Ni l'expression d'un RNAi-Nep3, Nep3-2, ni l'expression de peptides dAβ dans toutes les cellules ne provoque de défaut de MTM ($F_{(6,105)} = 3.510$, $p = 0.0034$, $n \geq 12$).

La diminution causée par le RNAi-Nep3-2 dans toutes les cellules adultes n'est pas suffisante pour provoquer un défaut de MTM. De même, l'expression de peptides dAβ ne permet pas de modulation de la MTM. Enfin, contrairement au RNAi-Nep1C, la diminution de Nep3 combinée avec l'expression de peptides dAβ dans toutes les cellules adultes ne provoque pas de défaut de MTM (Figure 41). Une interaction entre Nep3 et les peptides dAβ n'a pas pu être démontrée, soit n'existant pas, soit la diminution de Nep3 étant trop faible.

L'ensemble des résultats suggère que l'interaction entre Nep1 et dAβ est spécifique et qu'il n'y a pas de redondance entre les néprilysines exprimées dans les neurones DPM pour dégrader les peptides dAβ.

III. Article : Amnesiac is required in the *Drosophila* mushroom body for coincidence detection and memory formation

Introduction

Le mutant historique de mémoire amnesiac est connu depuis 1979 (Quinn et al., 1979). Son implication dans la mémoire a toujours été étudiée grâce à des mutants, comme le 1^{er} mutant *amn*¹, le mutant *amn*^{X8} ou *amn*^{CHPD}. En 2000, Waddell (Waddell et al., 2000) a montré que le gène amnesiac était exprimé dans les neurones DPM grâce à un marquage immunologique des DPM avec un anticorps anti-*amn* et grâce au sauvetage du mutant *amn*^{X8} en réexprimant une *UAS-amn*⁺ dans les neurones DPM. Néanmoins il a été proposé que les défauts observés chez les mutants soient dus à un défaut de développement et non à un défaut chez l'adulte car il a été impossible de sauver les défauts de mémoire en exprimant une *UAS-amn*⁺ chez l'adulte (DeZazzo et al., 1999). Nous avons donc utilisé deux RNAi contre amnesiac pour déterminer le rôle de ce gène dans la mémoire dans différentes structures.

Résultats principaux

Nous avons bien pu confirmer les résultats obtenus avec les mutants historiques habituellement utilisés : l'expression de RNAi dans les neurones DPM avec un driver constitutif provoque des défauts spécifiques de MTM et LTM. En revanche l'expression des RNAi chez l'adulte n'a pas permis de démontrer un rôle d'amnesiac dans la mémoire. De plus, nous avons pu montrer que l'expression d'un RNAi-amnesiac pendant le développement dans les neurones DPM provoquait des défauts de morphologie de ces neurones (augmentation de la taille du soma et défaut du guidage des neurites). Nous nous sommes ensuite penchés sur l'implication d'amnesiac dans la mémoire chez l'adulte. En exprimant des RNAi dans les MB, nous avons pu déterminer qu'amnesiac est requis dans les neurones α/β spécifiquement pour la MTM et la LTM.

Nous avons montré que les défauts de mémoire d'un mutant *amn*^{X8} peuvent être sauvés aussi bien par l'expression constitutive d'*amn* dans les neurones DPM que dans les neurones α/β , indiquant ainsi que si ce neuropeptide est surexprimé, il peut agir sur

les deux structures. Nous avons aussi pu répondre à la différence entre nos data et celles de Scott Waddell (Waddell et al., 2000) qui montraient que l'expression d'amn dans les MB, grâce aux pilotes d'expression c747 et c309, ne permettait pas de restaurer la mémoire d'un mutant amn^{x8}. En effet, nous avons reproduit l'absence de sauvetage avec le driver c747 et donnons des exemples trouvés dans la littérature montrant des différences, probablement dues à des patrons d'expression différents, entre les résultats obtenus avec les pilotes d'expression c739 et 238Y d'une part et c747 et c309 de l'autre.

Enfin nous avons montré que ce rôle dans la mémoire était dû à son implication dans la forte activation de l'AC lors de la détection de coïncidence permettant la formation de la MTM. Ce résultat prouve l'homologie fonctionnelle entre amnesiac et PACAP, qui permet la détection de coïncidence chez les mammifères.

Article

Title

Amnesiac is required in the *Drosophila* mushroom body for coincidence detection and memory formation

Author names

Oriane Turrel, Valérie Goguel*, Thomas Preat*

Author affiliation

Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

* These authors contributed equally to the work

Corresponding authors

Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: valerie.goguel@espci.fr

Thomas Preat, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: thomas.preat@espci.fr

Abstract

It was proposed that the *Drosophila amnesiac* gene is required for consolidation of aversive memory in the dorsal paired medial (DPM) neurons, a pair of neurons that broadly innervate the mushroom bodies (MB), the fly center for olfactory learning and memory. Using RNA interference, we show that *amnesiac* is required for normal development of DPM neurons and that acute inhibition of *amnesiac* expression in adult DPM neurons does not alter memory. Strikingly, we have identified α/β MB neurons as the cells in which *amnesiac* is acutely required in adults for middle-term and long-term memory. We further show that Amnesiac, a predicted adenylate cyclase-activating-like neuropeptide, is necessary for the coincidence detection that leads to steady PKA activation in the MB. Taken together, the data suggest that Amnesiac sustains the adenylate cyclase activation that is required for middle-term and long-term memory formation.

Introduction

Associative learning, which temporally pairs a conditioned stimulus (CS) to an unconditioned stimulus (US), is a powerful way of acquiring adaptive behavior. After associative learning, response to the CS will be modified according to the positive or negative value of the US. At molecular and cellular level, the association between CS and US is mediated by coincidence detection mechanisms that reflect the super-additive activation of a molecular pathway in the presence of both stimuli. One of the major coincidence detectors is the cAMP/PKA pathway, which depends on type-I adenylate cyclases that can be stimulated by both calcium/calmodulin and G-proteins coupled to metabotropic receptors¹. Following associative learning, information can be stored in different forms of memory that vary in their properties such as duration, stability upon interference with new learning etc.

The *Drosophila* model system is well suited to studying memory formation. In insects, the mushroom bodies (MB) constitute the central integrative brain structure for olfactory memory². They are composed of about 4,000 intrinsic neurons, called Kenyon cells (KC), classed into three subtypes whose axons form two vertical (α and α') and three medial (β , β' and γ) lobes³. In a classical conditioning paradigm in which an odorant (CS) is paired with the delivery of electric shocks (US), the fly is capable of forming six discrete memory phases reflected at neural network level⁴. Short-term memory (STM) is detected immediately after training and involves Rutabaga (Rut) adenylate cyclase activity in the MB⁵. Middle-term memory (MTM) and long-term memory (LTM) are non-immediate forms of memory whose formation also involves Rut activity in the MB⁶. Rut is thought to act as a coincidence detector in the MB that associates the olfactory and electric-shock pathways⁷⁻⁹. However, *in vivo* imaging experiments of the cAMP/PKA pathway using fluorescent probes to study coincidence detection have failed to identify specific events leading to distinct memory phases.

The *Drosophila amnesiac* mutant (*amn*) was first isolated in a behavioral screen for memory defects¹⁰. The *amn* gene encodes a predicted neuropeptide precursor with a signal sequence¹¹. Although the mature products of the *amn* gene have not been identified, sequence analyses point to three potential peptides, one of which is homologous to the mammalian pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)¹¹. PACAP is a neuropeptide that is widely expressed throughout the brain and acts as a neurotransmitter, neuromodulator or neurotrophic factor through activation of G-protein-linked receptors. It has been shown to regulate a variety of physiological processes through stimulation of cAMP production¹²⁻¹⁴, and may play a role in learning and memory¹¹. However, reports on the mnemonic effects of PACAP in mammals are few and conflicting¹⁵⁻¹⁹, and the precise function of PACAP during learning and memory remains poorly understood.

Amnesiac (AMN) is expressed in dorsal paired medial (DPM) neurons, a single pair of large neurons which broadly innervate all lobes of the MB²⁰. DPM output was shown to be required during the consolidation phase for MTM, prompting the notion that DPM might release the AMN modulatory neuropeptide which alters the physiology of MB neurons to help stabilize or consolidate odor memories²¹. It was later shown that DPM are serotonergic and that they are required after training for the consolidation of MT-ARM²², a form of anesthesia-resistant memory that co-exists with MTM⁴. However, despite many studies addressing the role of *amn* in memory, the function of the encoded peptide(s) remains obscure. Furthermore, memory rescue experiments succeeded when a wild-type *amn* transgene was expressed throughout development including the adult stage^{20,23} but not when its expression was limited to the adult stage²³, suggesting that *amn* might be required for development.

Here, to clarify the role of *amn* in memory, we used conditional RNA interference (RNAi). As expected, constitutive expression of *amn*-specific RNAi in DPM neurons mimicked memory phenotypes previously described for *amn* mutants, whereas, surprisingly, conditional

expression in adult DPM neurons did not impair memory. We also observed abnormal DPM morphology in *amn*-deficient flies. Taken together, the data suggest that *amn* expression in DPM neurons is required for neuronal development rather than memory. Strikingly, we show that AMN plays a key role in adult α/β neurons for MTM and LTM formation. Using two-photon imaging and fluorescent PKA FRET reporter probes to measure the dynamics of PKA responses in living flies, we obtained data establishing that *amn* is required for coincidence detection of dopamine and acetylcholine stimulation in the MB, the neurotransmitters that sustain associative learning and memory. These data are consistent with an adenylate cyclase-activating function of AMN.

Results

Acute inhibition of *amn* expression in adult DPM neurons does not induce memory defects. *amn* memory studies led to date have used constitutive *amn* mutants and so have not been able to address temporal and spatial requirements. To study the temporal involvement of *amn* in olfactory memory, we used conditional RNAi and GAL4-specific drivers. We targeted *amn* expression with a UAS-RNAi construct (*amn-RNAi1*) that was previously shown to phenocopy the thermal nociceptive defect of *amn* mutants²⁴. Memory was analyzed using the classical conditioning paradigm of odor-avoidance response. In this paradigm, groups of flies are successively exposed to two distinct odors, only one of which is associated with electric pulses. Immediate memory measured straight after a single conditioning (1-min memory) is a composite memory that includes STM encoded in γ KC⁴⁻⁶. Memory measured 2 h after a single conditioning is also a composite memory formed of labile MTM encoded in the α/β KC and MT-ARM encoded in γ KC⁴. The fly can also produce two exclusive forms of consolidated memory measured 24 h after training²⁵: long-term ARM (LT-ARM) is formed after 5 massed conditioning cycles whereas robust LTM is only formed after 5 spaced conditioning cycles. Crucially, LTM is the only memory phase that is dependent on *de novo* protein synthesis²⁶. LT-ARM and LTM are encoded in α'/β' and α/β KC, respectively^{4,6}.

We first analyzed the 2-h memory of flies constitutively expressing *amn-RNAi1* in DPM neurons. To this end, we used the *VT64246* GAL4-driver that specifically labels DPM neurons^{22,27}. As expected, *VT64246/amn-RNAi1* flies showed a significant 2-h memory deficit (Fig. 1a), and this result was confirmed with a second non-overlapping *amn-RNAi* construct (*amn-RNAi2*, Fig. 1a). To address the specificity of the memory phenotype, we next analyzed LTM and observed a strong LTM deficit (Fig. 1b). In contrast, *VT64246/amn-RNAi1* and *VT64246/amn-RNAi2* flies displayed normal scores when memory was assessed immediately after a single cycle of conditioning (Fig. 1c). The ability of these flies to avoid electric shocks

and their olfactory acuity to each odor after electric shock were verified as unaffected (Supplementary Table 1), showing that they displayed normal perception of the conditioning stimuli. We conclude that *amn-RNAi* expression in DPM neurons during development and in adulthood mimics memory phenotypes described for *amn*-mutant flies²², thus confirming *amn-RNAi* is an efficient tool for studying the effect of *amn* inhibition on memory.

We next investigated *amn* function specifically in adult DPM neurons. To restrict *amn-RNAi* expression to adulthood, we took advantage of the TARGET system²⁸ that relies on a conventional GAL4 activation system and a temperature-sensitive Gal80 inhibitor (Gal80^{ts}). Gal80^{ts} represses GAL4 transcriptional activity at low temperature (18°C) but this inhibition is abolished at high temperature (30°C), allowing GAL4-mediated transgene expression. Experiments were performed with a *tub-Gal80^{ts};VT64246* line that ubiquitously expresses Gal80^{ts} (*Gal80^{ts};VT64246*). Using an *UAS-mCD8::GFP* transgene, we first verified that the *Gal80^{ts};VT64246* driver generated a high level of expression after 3 days of induction at 30°C (Supplementary Fig. 1a), consistently with recent data showing that it leads to efficient RNAi expression after 3 days of induction²⁹. Surprisingly, *Gal80^{ts};VT64246/amn-RNAi1* and *Gal80^{ts};VT64246/amn-RNAi2* induced flies both showed normal 2-h memory (Fig. 1d). Even after 5 days of induction, *Gal80^{ts};VT64246/amn-RNAi1* flies displayed normal 2-h memory (Supplementary Fig. 1b). To confirm this data, we repeated the experiment with *tub-Gal80^{ts};VT26149* (VDRC, <http://brainbase.imp.ac.at/bbweb/#2?vdrctransid=204563>), another DPM-specific line that drives efficient expression in DPM neurons after induction (Supplementary Fig. 1a). After 5 days of induction, *Gal80^{ts};VT26149/amn-RNAi1* flies displayed normal 2-h memory (Supplementary Fig. 1b). We next analyzed LTM and found that neither *amn-RNAi1* nor *amn-RNAi2* expression in adult DPM neurons were able to induce a LTM deficit (Fig. 1e). In conclusion, constitutive inhibition of *amn* expression in DPM neurons leads to memory impairment whereas acute inhibition in adult flies does not. These

findings suggest that *amn* expression is required in DPM neurons during developmental stages, and not acutely during adulthood.

***amn* inhibition alters morphology of DPM neurons.** To investigate the potential influence of *amn* on the development of DPM neurons, we analyzed the morphology of these neurons in flies expressing mCD8::GFP and *amn-RNAi1* under the control of the *VT64246* driver. We observed a high arborization of DPM neurons onto the MB lobes. However, flies expressing *amn-RNAi* in DPM neurons exhibited DPM neurons that were morphologically abnormal on several aspects (Fig. 2). DPM axon path was modified in *amn*-deficient flies (Fig. 2b). In addition, the DPM cell bodies exhibited irregular shape and less accurate localization relative to the MB in *amn*-deficient flies (Fig. 2a), and the DPM cell bodies were bigger in flies expressing *amn-RNAi* in DPM neurons compared to controls (Fig. 2c). Taken together, the data indicate that *amn* expression in DPM neurons is required for normal development.

Acute inhibition of *amn* expression in adult MB neurons leads to memory defects. The next question addressed was whether AMN expression plays a role in adult brain for memory. In addition to a DPM enhancer, our analysis of GAL4-expression pattern suggested the presence of a second enhancer located upstream of the *amn* transcript that leads to specific expression in the MB (Supplementary Fig. 2a). To assess *amn* expression in MB neurons, we analyzed the effect of *amn-RNAi* expression under the control of the *238Y* driver known to label MB neurons³⁰. qPCR analyses revealed a decrease of *amn* mRNA level in *238Y/amn-RNAi1* and *238Y/amn-RNAi2* fly heads compared to controls (Supplementary Fig. 2b). As *238Y* GAL4 is expressed in neurons other than KC, we next used the *VT30559* driver that exclusively labels KC (VDRC, <http://brainbase.imp.ac.at/bbweb/#2?vdrctransid=206077>). *VT30559/amn-RNAi1* and *VT30559/amn-RNAi2* fly heads also expressed less *amn* mRNA

than controls (Supplementary Fig. 2c). Taken together, the data strongly suggest that *amn* is expressed in the MB.

We then investigated the involvement of *amn* in memory in the MB. Flies expressing *amn-RNAi* in all adult MB neuronal types with a conditional *tub-Gal80^{ts};238Y* driver (*Gal80^{ts};238Y*) showed abnormal 2-h memory (Fig. 3a) whereas non-induced flies showed normal scores (Fig. 3b), establishing that the memory deficit is caused by RNAi induction.

Memory measured 2 h after training is composed of two distinct phases: MTM, which is a labile memory sensitive to cold anesthesia, and MT-ARM which is resistant to anesthesia³¹. To examine which phase is affected by *amn* inhibition, we applied cold shock treatments to the flies. The memory scores of control flies dropped whereas the memory scores of *amn-RNAi*-expressing flies remained unaffected (Fig. 3c), indicating that MTM is absent. Furthermore, after cold shock treatment, *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi* flies exhibited similar memory scores to control flies, showing that MT-ARM is not affected. We next examined LTM after spaced training and observed that *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi* flies showed a strong LTM impairment (Fig. 3d,e) but normal 1-min memory (Fig. 3f) and LT-ARM (Fig. 3g). The sensory-motor capacities of these flies were normal (Supplementary Table 2). We next used the *VT30559* driver to knockdown *amn* expression specifically in KC. After 3 days of induction, *Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1* flies displayed impaired 2-h memory whereas non-induced flies displayed normal 2-h memory (Fig. 3h). We verified that *Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1* flies had perceived the stimuli used normally (Supplementary Table 2). In conclusion, inhibition of *amn* expression specifically in the adult MB recapitulates memory phenotypes previously reported for *amn*-mutant flies^{10,32}. In short, MTM and LTM are altered whereas STM and ARM remain unaffected.

Acute inhibition of *amn* expression in adult α/β neurons leads to memory defects.

Because MTM and LTM rely on the MB α/β neurons⁴, we next aimed to specifically restrict *amn* inhibition to α/β neurons using the inducible *tub-Gal80^{ts};c739* driver (*Gal80^{ts};c739*). Flies expressing *amn-RNAi* in adult α/β neurons exhibited deficits in 2-h memory (Fig. 4a,b) and LTM (Fig. 4c,d) but normal 1-min memory (Fig. 4e). We verified that their responses to the stimuli used for training were unaffected (Supplementary Table 3). To further characterize which KC *amn* is required for memory, we analyzed the effect of *amn* inhibition in adult α'/β' KC using a *tub-Gal80^{ts};VT30604* driver^{33,34}, and in adult γ KC using a *tub-Gal80^{ts};VT49483* driver (VDRC, <http://brainbase.imp.ac.at/bbweb/#2?vdrctransid=206419>). Neither α'/β' KC-driven *amn-RNAi1* expression (Fig. 4f) nor γ KC-driven *amn-RNAi1* expression (Fig. 4g) did impact MTM or LTM.

Taken together, the data show that *amn* is specifically required in the adult α/β KC for MTM and LTM formation. To strengthen these results, we carried out intersectional experiments using the MB247-Gal80 transgene (MB-Gal80^{27,35}). *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1*-induced flies showed mutant 2-h memory, as previously observed, whereas *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1;MB-Gal80*-induced flies displayed normal 2-h memory (Fig. 4h). Similarly, *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1* flies showed a strong LTM deficit whereas *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1;MB-Gal80* flies showed normal LTM (Fig. 4h). We conclude that preventing GAL4-mediated *amn-RNAi* expression in the MB with Gal80 abolishes memory deficits.

Taken together, the results demonstrate that AMN is acutely required in the α/β MB neurons for MTM and LTM formation.

Expression of the wild-type *amn* gene in either DPM or MB neurons of *amn*^{X8} mutant flies rescues their memory deficits. Waddell et al.²⁰ previously showed that reestablishing

amn expression in DPM neurons was sufficient to rescue the memory of *amn* mutant flies. However, the *c316* driver used in their study was later shown to also label, although to a lesser extent, other cells including KC³⁶. To address this issue, we aimed to reestablish *amn* expression specifically in DPM neurons of *amn*^{X8} null-mutant flies. To this end, we used the two DPM-specific drivers described above (Supplementary Fig. 1a). As expected, *amn*^{X8}/Y control flies expressing either driver (*amn*^{X8}/Y;VT64246/+ and *amn*^{X8}/+;VT26149/+) or containing the *UAS-amn* construct alone (*amn*^{X8}/Y;UAS-*amn*/+) showed strong 2-h memory deficits (Fig. 5a). *amn*^{X8}/Y;VT64246/UAS-*amn* and *amn*^{X8}/Y;VT26149/UAS-*amn* flies expressing *amn* specifically in DPM neurons showed significantly higher MTM scores than *amn*^{X8}/Y control groups (Fig. 5a), indicating a functional rescue. We next analyzed LTM and observed that LTM deficits displayed by *amn*^{X8}/Y genotypes were fully rescued by *amn* expression in DPM neurons (Fig. 5b). These data confirm that constitutive *amn* expression driven specifically in DPM neurons rescues the memory deficits of *amn*^{X8} null-mutant flies.

The next question to address was whether reestablishing *amn* gene expression in MB neurons of *amn*-null flies could rescue their memory deficits. Interestingly, *amn*^{X8}/Y;238Y/UAS-*amn* MTM scores were indistinguishable from 238Y/UAS-*amn* control fly scores (Fig. 5c), indicating a full rescue of the MTM deficit. Similarly, we also observed complete rescue of the LTM deficit (Fig. 5c). To confirm these results, we used the *c739* α/β -specific driver and found that *amn* expression driven in the α/β KC allows complete rescue of both the MTM and LTM deficit in *amn*^{X8}/Y flies (Fig. 5d).

These results contradict a previous study²⁰ reporting that *amn* expression in the MB failed to rescue the olfactory memory phenotypes of *amn*^{X8} flies²⁰. To resolve this apparent discrepancy, we also conducted rescue experiments with the same *c747* driver that Waddell et al.²⁰ used. We observed that *c747* GAL4-driven *amn* expression had no effect on the memory deficits of *amn*-null mutant flies (Fig. 5e). Thus, strikingly, *amn* expression driven by either

238Y or c739 rescues *amn*^{X8} memory deficits whereas expression driven by c747 does not, indicating that these drivers are functionally distinct.

In conclusion, *amn* expression in either DPM neurons or α/β KC is capable of restoring functional memory.

PKA activation in MB vertical lobes after coincidence detection is abolished in *amn*-deficient flies. To investigate AMN as a putative adenylyate cyclase-activating peptide, we analyzed PKA activation dynamics in MB neurons. In response to both dopamine (which represents the aversive US) and acetylcholine (which mimics the CS and leads to an increase in intracellular calcium), the fly adenylyate cyclase Rut mediates coincidence detection through an increase in cAMP concentration, resulting in PKA activation^{8,9}. Using a two-photon microscope, we conducted *in vivo* imaging of the PKA FRET probe AKAR2^{9,37,38} expressed in the MB⁹. As previously shown⁹, stimulation of normal brains with either dopamine or acetylcholine did not lead to PKA activation in vertical lobes (Fig. 6a) whereas co-stimulation did (Fig. 6b), thus demonstrating that coincidence detection occurred. In sharp contrast, co-stimulation of *amn*^{X8/Y} null mutant brains did not induce PKA activation in vertical lobes (Fig. 6b). We then analyzed the effect of *amn* reduction in the MB using *amn-RNAi1* and observed that like *amn*^{X8/Y} null flies, inhibition of *amn* expression in the MB led to defective coincidence detection following brain co-stimulation with dopamine and acetylcholine (Fig. 6b). We confirmed that the deficit observed did not result from an unspecific effect caused by RNAi expression using an RNAi-construct unrelated to *amn* (Supplementary Fig. 3).

We next analyzed the effect of bath application of dopamine at 100 μ M, a higher concentration known to activate Rut (Gervasi et al., 2010). As previously described, flies expressing the AKAR2 probe in the MB (+/Y;238Y/+;AKAR2/+) showed an increase in FRET ratio in the vertical lobes under these conditions (Fig. 6c). Stimulation with dopamine

at 100 μ M also induced increased PKA activity in *amn*^{X8}/*Y*;238*Y*;/+;*AKAR2*/+ brains (Fig. 6c). Similar results were obtained with *amn-RNAi1*-expressing flies (Fig. 6c), showing that AMN is not required for Rut response to high levels of dopamine. We further analyzed whether *amn* knockdown influences calcium signaling in the MB following acetylcholine application using the GCaMP3 probe³⁹ and observed that *amn*^{X8}-null flies exhibited a normal MB calcium response (Fig. 6d).

To strengthen our data, we next assessed coincidence detection under adult-stage specific acute *amn* downregulation. After 3 days of induction, *Gal80^{ts}/238Y;AKAR2/amn-RNAi1* flies showed defective coincidence detection following brain co-stimulation with dopamine and acetylcholine (Fig. 6e). Lastly, we investigated whether restoring *amn* expression in the MB of *amn*^{X8} flies restores coincidence detection and found that *amn*^{X8}/*Y*;238*Y*;/+;*AKAR2/UAS-amn* flies responded normally to co-applied dopamine and acetylcholine (Fig. 6f).

Taken together, the results establish that *amn* expression in KC is required for the PKA activation that sustains memory formation and/or consolidation, consistent with an adenylate cyclase-activating function⁴⁰.

Discussion

Here, we show using inducible inhibition of *amn* expression that AMN peptide is specifically required in adult MB α/β neurons for MTM and LTM. We further show that it is required for the PKA dynamics underlying coincidence detection for MTM and LTM in the vertical lobes, thus demonstrating the role of *amn* in cAMP signaling.

amn was initially proposed as involved in olfactory memory in DPM neurons²⁰. However, acute ubiquitous *amn* expression in the adult was unable to rescue memory phenotypes of *amn*^{X8} flies²³, suggesting that *amn* expression is required in DPM neurons during a developmental stage. Keene et al.²¹ analyzed DPM morphology in *amn*^l, *amn*^{ex1} and *amn*^{ex39} mutant fly brains using *c316* to drive GFP expression in DPM neurons, and concluded that *amn* is not essential for DPM targeting to the MB during development. Here, we show that although arborization onto the MB is still visible in flies expressing *amn-RNAi1* in DPM neurons, their abnormal DPM cell body and axon morphology indicates that *amn* expression in DPM neurons is required to achieve normal DPM development.

Strikingly, while constitutive expression of *amn-RNAi* in DPM neurons mimics memory deficits described for *amn* mutants, *amn* inhibition restricted to adult DPM neurons does not induce any memory impairment. The absence of a memory phenotype using conditional RNAi does not demonstrate that the target gene is not involved in memory processes, as we cannot rule out that conditional RNAi expression does not drive sufficient inhibition of the target gene expression to generate a loss-of-function phenotype. However, several lines of evidence suggest that *amn* expression is efficiently inhibited in adult DPM neurons: 1) each of the two distinct *amn-RNAi* constructs used here induces memory deficits when acutely expressed in the adult MB, 2) to achieve *amn* inhibition in adult DPM neurons, two distinct DPM drivers were used after up to 5 days of GAL4-induction, and 3) one of these specific drivers has been previously shown to generate strong memory deficits upon RNAi-mediated

silencing (Turrel et al., 2016). Taken together, the data is compelling evidence that *amn* expression in DPM neurons is required for a developmental stage of these neurons, and not during adulthood for memory processes.

Genes encoding components of the cAMP cascade, *rut*, *dnc* and *DCO* all express in the MB whereas *amn* expression has only previously been reported in DPM neurons²⁰. However, analysis of GAL4-expression pattern suggested the presence of a MB enhancer located upstream of the *amn* transcription unit. Indeed our data show that *amn* is expressed in the MB: *amn-RNAi* expression in the MB leads to reduced level of *amn* RNA, and conditional inhibition of *amn* expression in the adult MB recapitulates memory phenotypes previously reported for *amn* mutant flies^{10,22}. Importantly, immediate memory is not affected, showing that there is no deficit in acquisition. MTM and LTM are impaired, while MT-ARM and LT-ARM are normal, which is consistent with a requirement for *amn* in the α/β neurons known to sustain MTM and LTM processes⁴.

In agreement with *amn* requirement in the MB, we show that *amn* overexpression in α/β KC rescues *amn*^{X8} memory deficits. These results are in apparent contradiction with a previous study showing that restoring AMN expression in the MB of *amn*^{X8} flies did not restore normal MTM²⁰. However, we also observed a lack of memory rescue when using one of the MB drivers that Waddell et al.²⁰ had used, indicating that using distinct drivers to achieve AMN expression generates different results. Supporting these observations, several reports have previously described similar discrepancies among these MB drivers⁴¹⁻⁴³, perhaps reflecting different levels of expression and/or expression in different KC subpopulations.

Using two DPM-specific drivers we confirm previous data²⁰ showing that the *amn* memory phenotype is rescued by *amn* overexpression in DPM neurons. We conclude that, strikingly, *amn* memory phenotype is rescued by AMN overexpression in either DPM or KC neurons. Therefore, AMN overexpression in DPM neurons is capable of rescuing the functional deficit

in the adult MB, suggesting that the peptide, when overexpressed, can act as a paracrine signal. Conversely, AMN overexpression in KC during development is able to compensate the absence of AMN in DPM neurons. These observations probably reflect the high arborization of DPM neurons onto the MB lobes and the presence of a signal peptide suggesting that AMN is secreted¹¹.

The fact that one of AMN peptides is homologous to PACAP has prompted the hypothesis that it might activate the adenylylate cyclase Rut^{44,45}. Interestingly, studies conducted in the drosophila larvae muscle fiber showed that human PACAP is functionally related to AMN and that Rut can be activated by application of PACAP^{40,46}. Here, we show that AMN is required in the α/β KC for PKA activation, consistently with an adenylylate cyclase-activating function. PKA activation in the α/β KC sustains memory formation and/or consolidation^{44,47,48}, as is the case in mammals⁴⁹. Thus, like Rut, AMN is necessary for coincidence detection in response to dopamine and acetylcholine stimulation⁹. However, if AMN activates Rut, how do we explain that unlike *rut* mutants, *amn* mutants show a normal immediate memory? Two simple factors could explain this apparent contradiction. First, Rut adenylylate cyclase may be independently involved in the formation of immediate memory on one hand and MTM and LTM on the other. By independently, we mean different neuronal subsets within the MB, as previously reported^{6,50}, and possibly different cAMP effectors. Second, the fact that AMN plays a role in associative conditioning does not mean AMN-dependent memory will be built instantly—on the contrary, the notion that AMN peptide prolongs Rut activation after coincidence detection fits well with a progressive build-up of MTM²³. We thus propose that during associative conditioning, AMN is required in α/β neurons to boost and sustain the activation of Rut adenylylate cyclase, thereby allowing prolonged PKA activation and the progressive formation of lasting memory phases like MTM (after a single training cycle) and LTM (after spaced training). The strong coincidence

detection observed upon dopamine and acetylcholine stimulation in α/β neurons would correspond to an AMN-dependent prolonged activation of Rut required to form MTM and LTM. The coincidence detection mechanism leading to immediate memory remains to be identified. Importantly, AMN expression in the MB restores functional coincidence detection in *amn*-null mutant flies. Taken together, our data suggest that the AMN peptide secreted by MB upon conditioning would act autocrine-like to sustain Rut activity in α/β neurons.

In conclusion, we report here an acute role of AMN via the PKA pathway in the α/β MB neurons for memory formation. Our results suggest that AMN released by the MB may activate AMN receptors located at KC membranes to retain information over time.

Methods

Drosophila stocks. *Drosophila melanogaster* wild-type strain Canton Special (CS) and mutant flies were raised on standard medium at 18°C in 60% humidity in a 12 h light/dark cycle. All strains used for memory experiments were outcrossed to the CS background. *amn-RNAi* lines were obtained from the Vienna Drosophila Resource Center (VDRC, *amn-RNAi1*, ID 5606) and from the Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana University, *amn-RNAi2*, ID 25797). GAL4 drivers used to achieve RNAi expression were *VT64246* (VDRC, ID 264246) and *VT26149* (VDRC, ID 204563) for expression in DPM neurons, *238Y*, *c747* and *VT30559* (VDRC, ID 206077) for expression in the MB, *c739* for expression in α/β neurons, *VT30604* (VDRC, ID 200228) for expression in α'/β' neurons, and *VT49483* (VDRC, ID 206419) for expression in γ neurons. To specifically induce RNAi expression in adults, we took advantage of the TARGET system²⁸. To achieve RNAi induction, flies were kept at 30°C for 3 d before conditioning, and also until memory test for LTM and LT-ARM analyses. To specifically block RNAi induction in the MB, MB247-Gal80 (MB-Gal80,⁵¹) was used. Rescue experiments were conducted with the *UAS-amn* described in Waddell et al.²⁰.

Behavioral experiments. Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described by Pascual and Preat⁵². Training and testing were performed at 25°C in 80% humidity. Conditioning was performed on samples of 25–35 flies aged between 3 and 4 d with 3-octanol (~95% purity, Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol (99% purity, Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International). Memory tests were performed with a T-maze apparatus⁵³. Flies were given 1 min to choose between two arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the sum of flies in both arms. The average of two reciprocal experiments gave a performance index (PI).

For analyses of immediate memory, flies were tested immediately after a single training cycle (1-min memory). To assess MTM, flies were submitted to one-cycle training, and memory was tested 2 h later. Cold anesthesia was achieved by a 2-min cold shock performed 1 h before the test. For LTM analyses, flies were trained with 5 cycles spaced at 15 min rest intervals, and tested 24 h later, and for LT-ARM analyses, flies were submitted to five massed conditioning cycles and memory was tested 24 h later. For odor avoidance tests after electric shock and response to electric shock, flies were treated as described by Pascual and Preat⁵².

Immuno-histochemistry experiments. *VT64246;UAS-mCD8::GFP* female flies were crossed to *amn-RNAi1* males. Brains of female F1 progenies (3-4 days after hatching at 25°C) were dissected and fixed for 20 min at room temperature in 4% formaldehyde in PBT (PBS containing 1% Triton X-100). Samples were then rinsed three times for 20 min in PBT, blocked with 2% bovine serum albumin in PBT for 2 h, and further incubated at 4°C overnight with primary antibodies at 1:400 (rabbit anti-GFP, Thermo Fisher Scientific) in the blocking solution. Brains were washed three times for 20 min in PBT and then incubated at 4°C overnight with secondary antibodies at 1:400 (anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific) in the blocking solution. After three washes (20 min), brains were mounted in the Prolong Mounting Medium (Life Technologies) for microscopy analysis. Images were acquired with a Nikon A1R confocal microscope. Confocal Z-stacks were acquired in 1.5 µm slices and imported into NIH ImageJ for analyses. For axonal length Fiji's plugin Simple Neurite Tracer⁵⁴ was used in order to determine the trajectory and length of the axone along all plans in stack images. For soma volume, we used Fiji's plugin Volumest⁵⁵.

Live imaging. Preparation of flies for live imaging was performed as previously described⁵⁶. Untrained flies were removed from culture bottles and glued to a plastic coverslip coated with

a thin transparent plastic sheet. The coverslip was then placed on the recording chamber. A drop of *Drosophila* Ringer's solution was placed over the head (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 36 mM sucrose, 5 mM HEPES-NaOH [pH 7.3]). A small region of cuticle was cut away from the top of the head capsule, and tracheas were removed from the area. Flies were then placed under a Leica TCS-SP5 microscope and observed with a 25x water-immersion objective (NA = 0.95, Leica). Experiments were performed at room temperature. Brains were continuously perfused with *Drosophila* Ringer's solution. Four frames were acquired per minute. Dopamine and acetylcholine were purchased from Sigma-Aldrich. For AKAR2-FRET experiments, two-photon excitation was obtained with a mode-locked Ti:sapphire laser (Mai Tai, Spectra Physics) set at 860 nm. The specifications of the detection channels were identical to those described in Gervasi et al.⁹. Scanning and acquisition were controlled by LAS AF software (Leica). CFP and YFP images (512 x 512 pixels) were acquired simultaneously with a line rate of 400 Hz. To analyze calcium response, the GCaMP3 probe was excited by the 488 nm line of an argon laser, scanning at a line rate of 400 Hz. Fluorescence-induced light emission was collected by a photomultiplier in the 505–555 nm wavelength range.

Image analysis. To obtain FRET ratio time courses, CFP and YFP images at each time point were background subtracted (background was evaluated as the mean intensity over a region of interest placed in a non-fluorescent part of the brain). YFP and CFP emission intensities for each image were then averaged within a region of interest delimited by hand and surrounding the α lobes of the MB. These values were used to calculate the yellow/cyan emission ratio, which was then normalized to the baseline ratio. The baseline consists in the first 20 time points of the acquisition. Drugs were applied just after the 20th time point (300 s), and analyses were made from 500 to 700 s of acquisition. Compensation for photobleaching,

determined during baseline, was applied for all flies for each experiment.

Statistical analyses. Scores resulting from all genotypes were analyzed using one-way ANOVA followed, if significant at $p \leq 0.05$, by Newman–Keuls multiple comparisons tests. Overall ANOVA p -value is given in the legends along with the value of the corresponding Fisher distribution $F_{(x,y)}$, where x is number of degrees of freedom for groups and y is total number of degrees of freedom for the distribution. Asterisks on the figure denote the least significant of the pairwise *post hoc* comparisons between the genotype of interest and its controls, following the usual nomenclature. For imaging experiments with 2 groups, measurements were analyzed using Student's t tests. All data are displayed as mean $\pm$ SEM.

References

- Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.
- Akalal DBG, Yu D, Davis RL (2010) A Late-Phase, Long-Term Memory Trace Forms in the γ Neurons of *Drosophila* Mushroom Bodies after Olfactory Classical Conditioning. *J Neurosci* 30:16699–16708.
- Aldrich BT, Kasuya J, Faron M, Ishimoto H, Kitamoto T (2010) The amnesiac gene is involved in the regulation of thermal nociception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 24:33–41.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2015) Amyloid- β protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12:32–46.
- Barnes K, Turner AJ, Kenny AJ (1992) Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurochem* 58:2088–2096.
- Barnstedt O, Oswald D, Felsenberg J, Brain R, Moszynski J-P, Talbot CB, Perrat PN, Waddell S (2016) Memory-Relevant Mushroom Body Output Synapses Are Cholinergic. *Neuron* 89:1237–1247.
- Baumkotter F, Schmidt N, Vargas C, Schilling S, Weber R, Wagner K, Fiedler S, Klug W, Radzimanowski J, Nickolaus S, Keller S, Eggert S, Wild K, Kins S (2014) Amyloid Precursor Protein Dimerization and Synaptogenic Function Depend on Copper Binding to the Growth Factor-Like Domain. *J Neurosci* 34:11159–11172.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23:213–227.
- Ben Khalifa N, Tyteca D, Marinangeli C, Depuydt M, Collet JF, Courtoy PJ, Renauld JC, Constantinescu S, Octave JN, Kienlen-Campard P (2012) Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *The FASEB Journal* 26:855–867.
- Bernards A, Hariharan IK (2001) Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11:274–278.
- Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, Saki N (2015) Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*:1–11.

- Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Bland ND, Robinson P, Thomas JE, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE (2009) Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2. *Peptides* 30:571–574.
- Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *NeuroReport* 8:1025–1029.
- Bourdet I, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2015a) Amyloid- β Peptide Exacerbates the Memory Deficit Caused by Amyloid Precursor Protein Loss-of-Function in *Drosophila*. *PLoS ONE* 10:e0135741–14.
- Bourdet I, Preat T, Goguel V (2015b) The Full-Length Form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein Is Involved in Memory Formation. *J Neurosci* 35:1043–1051.
- 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.
- 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.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 82:239–259.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.
- Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Grönke S, Partridge L (2015) A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 in vivo. *Acta Neuropathologica* 130:35–47.
- Busto GU, Cervantes-Sandoval I, Davis RL (2010) Olfactory Learning in *Drosophila*. *Physiology* 25:338–346.
- Cabrero P, Radford JC, Broderick KE, Costes L, Veenstra JA, Spana EP, Davies SA, Dow JAT (2002) The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *J Exp Biol* 205:3799–3807.
- Cao W, Song HJ, Gangi T, Kelkar A, Antani I, Garza D, Konsolaki M (2008) Identification of Novel Genes That Modify Phenotypes Induced by Alzheimer's β -Amyloid Overexpression in *Drosophila*. *Genetics* 178:1457–1471.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tschäpe J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretzschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Caron SJC, Ruta V, Abbott LF, Axel R (2013) Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* 497:113–117.

- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.
- Colombo S, Broggi S, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Martegani E (2017) Detection of cAMP and of PKA activity in *Saccharomyces cerevisiae* single cells using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) probes. *Biochem Biophys Res Commun* 487:594–599.
- Comas D, Petit F, Preat T (2004) *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430:460–463.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Dauwalder B, Davis RL (1995) Conditional rescue of the dunce learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes. *J Neurosci* 15:3490–3499.
- Davis RL (2011) Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70:8–19.
- Davis RL, Cherry J, Dauwalder B, Han PL, Skoulakis E (1995) The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Mol Cell Biochem* 149-150:271–278.
- de Belle SJ, Heisenberg M (1994) Associative Odor Learning in *Drosophila* Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies. *Science* 263:692–695.
- DeZazzo J, Xia SZ, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999) Developmental expression of an amn(+) transgene rescues the mutant memory defect of amnesiac adults. *J Neurosci* 19:8740–8746.
- Didelot G, Molinari F, Tchénio P, Comas D, Milhiet E, Munnich A, Colleaux L, Preat T (2006) Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313:851–853.
- Dubnau J, Chiang A-S (2013) Systems memory consolidation in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* 23:84–91.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1684–1688.
- Dudai Y, Uzzan A, Zvi S (1983) Abnormal activity of adenylate cyclase in the *Drosophila* memory mutant rutabaga. *Neuroscience Letters* 42:207–212.
- Dura J-M, Preat T, Tully T (1993) Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 21:307–320.
- Elliott DA, Brand AH (1999) The GAL4 System. *Nature* 400:457–461.
- Farca Luna AJ, Perier M, Seugnet L (2017) Amyloid Precursor Protein in *Drosophila* Glia Regulates Sleep and Genes Involved in Glutamate Recycling. *J Neurosci* 37:4289–4300.
- Fiala A, Spall T (2003) In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic

- cameleon expression. *Sci STKE* 2003:PL6–pl6.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's A β ₄₂-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Freeman MR (2015) *Drosophila Central Nervous System Glia*. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7:a020552–15.
- Freeman MR, Doherty J (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci* 29:82–90.
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A β pathology. *Neurosci Res* 43:39–56.
- Gao Q, Yuan B, Chess A (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3:780–785.
- Garcia-Osta A, Alberini CM (2009) Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* 16:267–272.
- George S, Petit GH, Gouras GK, Brundin P, Olsson R (2013) Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators and Selective Estrogen Receptor β Agonists Moderate Cognitive Deficits and Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci* 4:1537–1548.
- 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.
- Goedhart J, Gadella TWJ (2009) Fluorescence resonance energy transfer imaging of PKC signalling in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *Journal of The Royal Society Interface* 6:S27–S34.
- Goguel V, Belair AL, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Gouras GK, Olsson TT, Hansson O (2014) β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 12:3–11.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2010) Intraneuronal A β ₄₂ Accumulation in Human Brain. *AJPA* 156:15–20.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P, Deschodt-Lanckman M (1997) Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) Degradation by the Neutral Endopeptidase EC 3.4.24.11. *Biochem Pharmacol* 54:509–515.

- Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77.
- Gunawardena S, Goldstein LS (2001) Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32:389–401.
- Hallier B, Schiemann R, Cordes E, Vitos-Faleato J, Walter S, Heinisch JJ, Malmendal A, Paululat A, Meyer H (2016) *Drosophila* neprilysins control insulin signaling and food intake via cleavage of regulatory peptides. *eLife* 5:250.
- Han Z, Jin L, Platasa J, Cohen LB, Baker BJ, Pieribone VA (2013) Fluorescent Protein Voltage Probes Derived from ArcLight that Respond to Membrane Voltage Changes with Fast Kinetics. *PLoS ONE* 8:e81295–e81299.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, Svoboda K (2008) A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19264–19269.
- Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2002) Higher brain functions of PACAP and a homologous *Drosophila* memory gene amnesiac: insights from knockouts and mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 297:427–432.
- Haynes PR, Christmann BL, Griffith LC (2015) A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 4:e03868.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rülcke T, Kretschmar von H, Koch von C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO Journal* 23:4106–4115.
- Hong CS, Koo EH (1997) Isolation and characterization of *Drosophila* presenilin homolog. *NeuroReport* 8:665–668.
- Hüttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirths O (2015) Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44:1291–1302.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) A β 42 Mutants with Different Aggregation Profiles Induce Distinct Pathologies in *Drosophila*. Lashuel H, ed. *PLoS ONE* 3:e1703–e1708.
- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for

- Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6623–6628.
- Imai T, Sakano H, Vosshall LB (2010) Topographic mapping--the olfactory system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001776.
- Isabel G, Pascual A, Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304:1024–1027.
- Isabel G, Preat T (2008) Molecular and system analysis of olfactory memory in *Drosophila*. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*.
- Isbert S, Wagner K, Eggert S, Schweitzer A, Multhaup G, Weggen S, Kins S, Pietrzik CU (2011) APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. *Cell Mol Life Sci* 69:1353–1375.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 5:52–77.
- Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S-I, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Saido TC (2004) Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid-beta Peptide in Mouse Brain. *J Neurosci* 24:991–998.
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70:493–500.
- Jacobsen KT, Iverfeldt K (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* 66:2299–2318.
- Jefferis GSXE, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlfsing T, Maurer CR, Luo L (2007) Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128:1187–1203.
- Jin L, Han Z, Platasa J, Woollorton JRA, Cohen LB, Pieribone VA (2012) Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* 75:779–785.
- Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH (2005) A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J Exp Biol* 208:1239–1246.
- Kakiya N, Saito T, Nilsson P, Matsuba Y, Tsubuki S, Takei N, Nawa H, Saido TC (2012) Cell Surface Expression of the Major Amyloid- β Peptide (A β)-degrading Enzyme, Neprilysin, Depends on Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase (MEK) and Dephosphorylation by Protein Phosphatase 1a. *J Biol Chem* 287:29362–29372.
- Kandel E, Abel T (1995) Neuropeptides, Adenylyl-Cyclase, and Memory Storage. *Science* 268:825–826.
- Keene AC, Krashes MJ, Leung B, Bernard JA, Waddell S (2006) *Drosophila* dorsal paired

- medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* 16:1524–1530.
- Keene AC, Stratmann M, Keller A, Perrat PN, Vosshall LB, Waddell S (2004) Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44:521–533.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Schally AV (2011) Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22:311–317.
- Knappek S, Sigrist S, Tanimoto H (2011) Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J Neurosci* 31:3453–3458.
- Lasher RS, Lutz EM, Mulholland F, Sanderson R, Stewart JM, Bublitz C (1990) Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in the nucleus tractus solitarius of the rat brain. *Neuroscience Letters* 117:43–49.
- 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 USA* 108:13794–13799.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-Linking of Cell Surface Amyloid Precursor Protein Leads to Increased β -Amyloid Peptide Production in Hippocampal Neurons: Implications for Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Leulier F, Lemaitre B (2008) Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 9:165–178.
- Leuschner PJF, Obernosterer G, Martinez J (2005) MicroRNAs: Loquacious Speaks out. *Curr Biol* 15:R603–R605.
- Li Y, Hoxha V, Lama C, Dinh BH, Vo CN, Dauwalder B (2011) The hector G-Protein Coupled Receptor Is Required in a Subset of fruitless Neurons for Male Courtship Behavior. *PLoS ONE* 6:e28269–10.
- 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.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human Amyloid Precursor Protein Ameliorates Behavioral Deficit of Flies Deleted for *Appl* Gene. *Neuron* 9:595–605.
- Ma J, Ptashne M (1987) The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50:137–142.

- Marin EC, Jefferis GSXE, Komiyama T, Zhu H, Luo L (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109:243–255.
- Martin-Morris LE, White K (1990) The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* 110:185–195.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765–1768.
- Meilandt WJ, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito LA, Searce-Levie K, Cheng IH, Yu GQ, Mucke L (2009) Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J Neurosci* 29:1977–1986.
- Merdes G, Soba P, Loewer A, Bilic MV, Beyreuther K, Paro R (2004) Interference of human and *Drosophila* APP and APP-like proteins with PNS development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* 23:4082–4095.
- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH (2005) PDF Receptor Signaling in *Drosophila* Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. *Neuron* 48:213–219.
- Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A (2009) Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer* 8:128–12.
- Moretti C, Mencacci C, Frajese GV, Cerilli M, Frajese G (2002) Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13:428–435.
- Murthy M, Fiete I, Laurent G (2008) Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 59:1009–1023.
- Müller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393–406.
- Müller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006288.
- Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ (2012a) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 120 Suppl 1:167–185.
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012b) The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Neprilysin: Can We Control It? *Int J Alzheimers Dis* 2012.

- Nalivaeva NN, Turner AJ (2013) The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters* 587:2046–2054.
- Neve RL, McPhie DL, Chen YH (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Nichols CD (2006) *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics* 112:677–700.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204.
- Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I (1995) Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem* 270:4205–4208.
- Panz M, Vitos-Faleato J, Jendretzki A, Heinisch JJ, Paululat A, Meyer H (2012) A novel role for the noncatalytic intracellular domain of Neprilysins in muscle physiology. *Biol Cell* 104:553–568.
- Pardossi-Piquard R, Checler F (2011) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120:109–124.
- Pascual A, Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004) A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117:83–94.
- Pitman JL, Huetteroth W, Burke CJ, Krashes MJ, 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.
- Plaçais P-Y, de Treder É, Scheunemann L, Trannoy S, Goguel V, Han K-A, Isabel G, Preat T (2017) Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nat Comms* 8:15510.
- Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, Mohajeri MH (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A β -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis* 24:475–483.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A (2015) The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience* 307:26–36.
- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O (2011) Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819–830.

- Qiu Y, Davis RL (1993) Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes & development* 7:1447–1458.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:708–712.
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* 277:212–214.
- Ramoya P, Benton R (2010) Evolving olfactory systems on the fly. *Trends Genet* 26:307–316.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczerzak E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F, Kojro E (2011) Neuropeptide pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *The FASEB Journal* 25:3208–3218.
- Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M (2017) Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res* 14:1–1.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 11:1114–1125.
- Robinson SR, Bishop GM (2002) A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:1051–1072.
- Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolaños JP (2013) Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: Role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochemistry International* 62:750–756.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a Conserved Metalloprotease-Disintegrin Protein with Two Roles in *Drosophila* Neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo L, White K (1989) A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2478–2482.
- Saito S, Ihara M (2014) New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci* 6.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434–439.
- Sample V, Mehta S, Zhang J (2014) Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of cell science* 127:1151–1160.
- San Martín A, Ceballo S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y,

- Alegría K, Barros LF (2014) Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS ONE* 9:e85780.
- Sarantseva S, Timoshenko S, Bolshakova O, Karaseva E, Rodin D, Schwarzman AL, Vitek MP (2009) Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 4:e8191.
- Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M (2012) BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 414:171–178.
- Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Séjourné J, Plaçais P-Y, Aso Y, Siwanowicz I, Trannoy S, Thoma V, Tedjakumala SR, Rubin GM, 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.
- Sitnik JL, Francis C, Hens K, Huybrechts R, Wolfner MF, Callaerts P (2014) Neprilysins: An Evolutionarily Conserved Family of Metalloproteases That Play Important Roles in Reproduction in *Drosophila*. *Genetics* 196:781–797.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL (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.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The *Drosophila* Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562–13.
- Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, Patrick C, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2008) Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular A β and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:109–112.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170–175.
- Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218:341–347.
- Stahl R, Schilling S, Soba P, Rupp C, Hartmann T, Wagner K, Merdes G, Eggert S, Kins S (2014) Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front Cell Neurosci* 8:410.
- Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Stozická Z, Zilka N, Novák M (2007) Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol* 51:205–222.
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13:1852–1861.
- Sutcliffe B, Forero MG, Zhu B, Robinson IM, Hidalgo A (2013) Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *PLoS ONE* 8:e75902–e75915.
- Tampellini D, Rahman N, Lin MT, Capetillo-Zarate E, Gouras GK (2011) Impaired β -Amyloid Secretion in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Neurosci* 31:15384–15390.
- Tamura T, Chiang A-S, Ito N, Liu H-P, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M (2003) Aging specifically impairs amnesiac-dependent memory in *Drosophila*. *Neuron* 40:1003–1011.
- Tanaka NK, Tanimoto H, Ito K (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* 508:711–755.
- Tanzi RE, Bertram L (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181–184.
- Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, Bland ND (2005) *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function. *Biochem J* 386:357–366.
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* 6:875–U113.
- Tonoki A, Davis RL (2012) Aging impairs intermediate-term behavioral memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6319–6324.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K (1999a) Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9:489–493.
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the *Drosophila* Member of the APP-Family, Exhibits Differential Trafficking and Processing in CNS Neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999b) The *Drosophila* β -amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.
- Tudorache IF, Trusca VG, Gafencu AV (2017) Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. *Comput*

- Struct Biotechnol J 15:359–365.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical-Conditioning and Retention in Normal and Mutant *Drosophila-Melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157:263–277.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261–269.
- Turrel O, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2016) *Drosophila* Neprilysins Are Involved in Middle-Term and Long-Term Memory. *J Neurosci* 36:9535–9546.
- van der Voet M, Nijhof B, Oortveld MAW, Schenck A (2014) *Drosophila* models of early onset cognitive disorders and their clinical applications. *Neurosci Biobehav Rev* 46:326–342.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102:147–159.
- Wachowiak M, Knöpfel T (2009) Optical Imaging of Brain Activity In Vivo Using Genetically Encoded Probes. In: *In Vivo Imaging of Brain Function*, 2nd ed. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG (2000) The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103:805–813.
- Waddell S, Quinn WG (2001) What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet* 17:719–726.
- Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S (2007) Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 28:1713–1719.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretzschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wu C-L, Shih M-FM, Lai JS-Y, Yang H-T, Turner GC, 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.
- Wu C-L, Shih M-FM, 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.
- Yamamoto S, Schulze KL, Bellen HJ (2014) Introduction to Notch Signaling. In: *Notch Signaling*, pp 1–14 *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.
- Yamashima T (2013) Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain–cathepsin

- hypothesis'—A perspective review. *Prog Neurobiol* 105:1–23.
- Yamashima T (2016) Can “calpain-cathepsin hypothesis” explain Alzheimer neuronal death? *Ageing Research Reviews* 32:169–179.
- Yang C-H, Shih M-FM, Chang C-C, Chiang M-H, Shih H-W, Tsai Y-L, Chiang A-S, Fu T-F, Wu C-L (2016) Additive Expression of Consolidated Memory through *Drosophila* Mushroom Body Subsets. *PLoS Genet* 12:e1006061.
- Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K (1995) Subdivision of the *Drosophila* Mushroom Bodies by Enhancer-Trap Expression Patterns. *Neuron* 15:45–54.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919:115–121.
- Yin JC, Wallach JS, Wilder EL, Klingensmith J, Dang D, Perrimon N, Zhou H, Tully T, Quinn WG (1995) A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol Cell Biol* 15:5123–5130.
- Yu D, Akalal D-BG, 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.
- Yu D, Keene AC, Srivatsan A, Waddell S, Davis RL (2005) *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123:945–957.
- Yu D, Ponomarev A, Davis RL (2004) Altered Representation of the Spatial Code for Odors after Olfactory Classical Conditioning: Memory Trace Formation by Synaptic Recruitment. *Neuron* 42:437–449.
- Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY (2005) Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437:569–573.
- Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14997–15002.
- Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegeneration* 1:5.
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegeneration* 6.
- Zhou L, Wei C, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang R, Wang D-S (2013) Distinct subcellular patterns of neprilysin protein and activity in the brains of Alzheimer's disease patients, transgenic mice and cultured human neuronal cells. *Am J Transl Res* 5:608–621.
- Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21:1369–1377.

Acknowledgments

T.P. received grant support from the French national agency for research [*Agence Nationale de la Recherche*] (11BSV40071 and ANR-15-CE32-0008-01) and the French foundation for medical research [*Fondation pour la Recherche Médicale*] (DEQ20140329540). We thank Aurélie Lampin-Saint-Amaux for help with the qPCR experiments, Yann Dromard for help with the immunohistology experiments, and Pierre-Yves Plaçais for characterization of some *tub-Gal80^{ts}* GAL4-lines. We also thank all the members of our laboratory and Nicolas Gervasi (Inserm/UPMC, Institut du Fer à Moulin) for valuable discussive input and for critically reading this manuscript.

Author contributions

O.T., V.G. and T.P. designed the project, O.T. performed the experiments, O.T. and V.G. analyzed the data, O.T., V.G. and T.P. wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information (3 Tables and 3 Figures)

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Figures

Figure 1

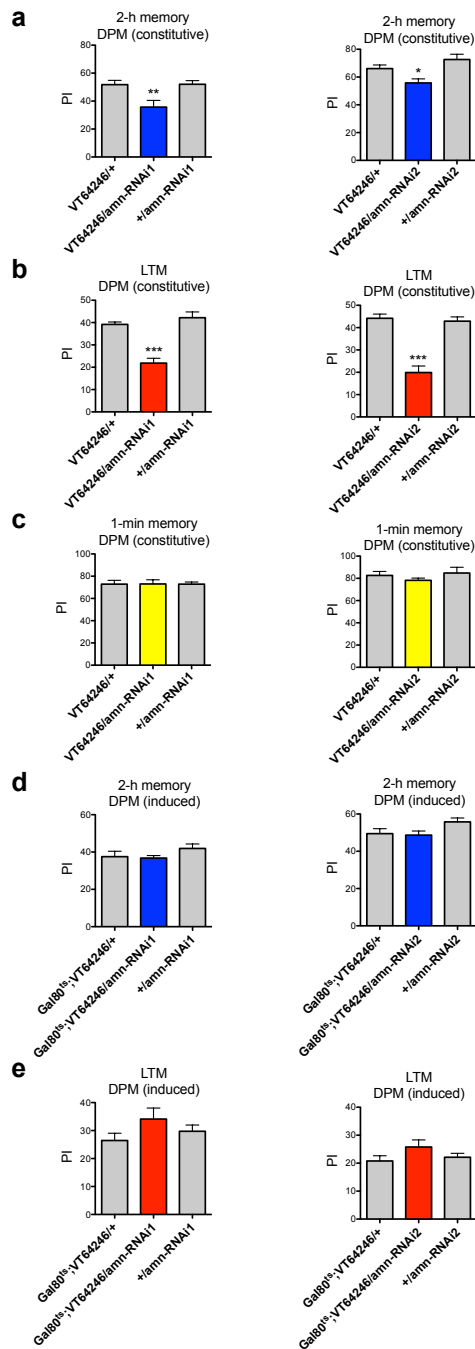


Figure 1. Acute inhibition of *amn* expression in adult DPM neurons does not induce memory defects.

(a) Constitutive expression of *amn-RNAi* in DPM neurons leads to a 2-h memory deficit. Flies expressing *amn-RNAi1* or *amn-RNAi2* under the control of the constitutive *VT64246* driver exhibit significantly lower scores than genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 6.793$, $p =$

0.0041, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,39)} = 7.415$, $p = 0.0020$, $n \geq 13$). **(b)** Constitutive expression of *amn-RNAi* in DPM neurons leads to a LTM deficit. Flies expressing *amn-RNAi1* or *amn-RNAi2* under the control of the *VT64246* driver exhibit significantly lower scores than genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,34)} = 29.67$, $p < 0.0001$, $n \geq 11$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,34)} = 35.47$, $p < 0.0001$, $n \geq 11$). **(c)** Immediate memory is not altered by constitutive expression of *amn-RNAi* in DPM neurons. *VT64246/amn-RNAi1* and *VT64246/amn-RNAi2* flies show similar scores to genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.0003356$, $p = 0.9997$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,14)} = 0.7781$, $p = 0.4811$, $n = 5$). **(d,e)** To induce RNAi expression, flies were incubated for 3 d at 30°C prior to conditioning, and also until memory test for LTM analyses. **(d)** Acute inhibition of *amn* expression in DPM neurons does not impact 2-h memory. *amn-RNAi*-expressing flies show similar scores to genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,47)} = 1.479$, $p = 0.2388$, $n = 16$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,46)} = 2.906$, $p = 0.0653$, $n \geq 15$). **(e)** Acute inhibition of *amn* expression in DPM neurons does not affect LTM. *amn-RNAi*-expressing flies show similar scores to genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,24)} = 1.693$, $p = 0.2070$, $n \geq 8$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 1.711$, $p = 0.1997$, $n = 10$).

Figure 2

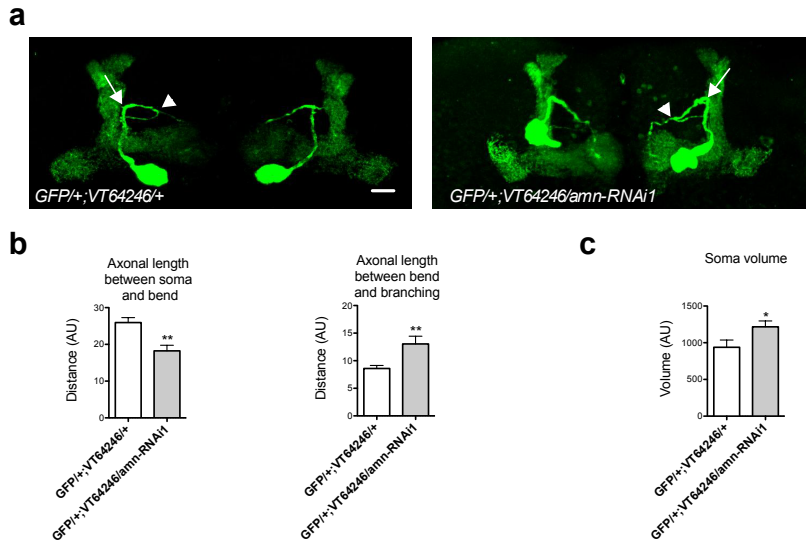


Figure 2. *amn* inhibition alters DPM neurons morphology.

Constitutive expression of *amn-RNAi1* in DPM neurons alters their morphology. DPM neurons were revealed using anti-GFP staining. **(a)** A representative brain of each genotype is shown. Scale bar is 10 μ m. **(b)** Axon measurements. Axon length between the cell body and the major axonal bend (arrow) is reduced in *VT64246/mCD8::GFP;amn-RNAi1/+* compared to *VT64246/mCD8::GFP* control flies (*t* test, $**p = 0,0011$, $n = 12$) whereas axon length between the bend and the DPM axonal bifurcation point (arrowhead) is increased (*t* test, $**p = 0,0074$, $n = 12$). **(c)** DPM cell body volume is increased in *VT64246/mCD8::GFP;amn-RNAi1/+* compared to *VT64246/mCD8::GFP* control flies (*t* test, $*p = 0,0405$, $n = 12$). AU arbitrary unit.

Figure 3

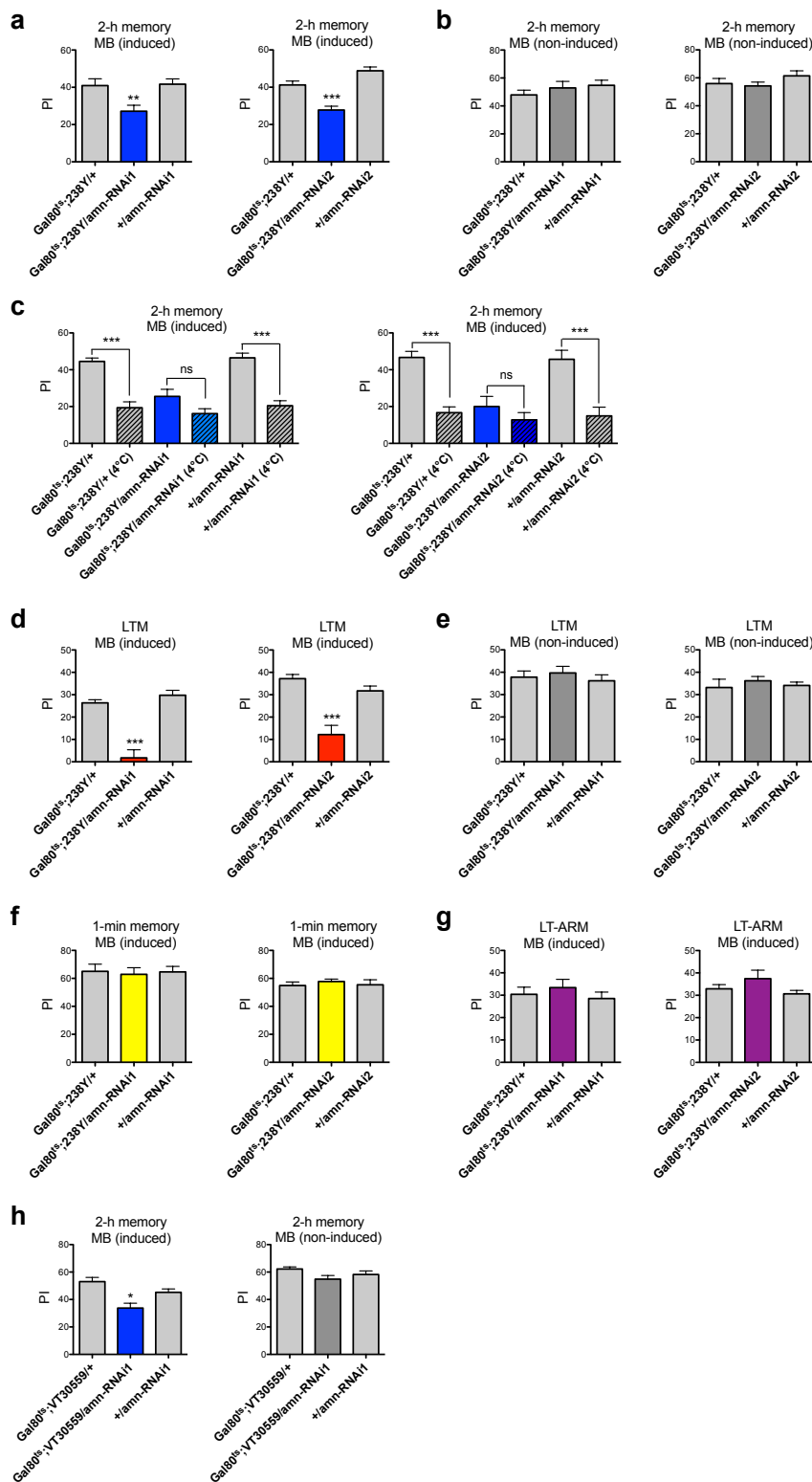


Figure 3. Acute inhibition of *amn* expression in adult MB neurons leads to memory defects.

(a,b) *amn* inhibition in adult MB neurons induces MTM defects. **(a)** Flies expressing *amn-RNAi* in the adult MB exhibit a 2-h memory deficit (*amn-RNAi1*: $F_{(2,35)} = 7.348$, $p = 0.0023$, $n = 12$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,39)} = 27.81$, $p < 0.0001$, $n \geq 13$). **(b)** Non-induced flies display normal 2-h memory scores (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.8215$, $p = 0.4505$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,34)} = 1.242$, $p = 0.3024$, $n \geq 11$). **(c)** Where indicated (4°C), flies were submitted to 2-minute cold shock 1 h before the memory test. Cold shock treatment induces a memory decrease in control flies but not in *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi* flies (*amn-RNAi1*: $F_{(5,75)} = 21.99$, $p < 0.0001$, $n \geq 12$; *amn-RNAi2*: $F_{(5,71)} = 12.98$, $p < 0.0001$, $n = 12$). **(d,e)** *amn* inhibition in adult MB neurons induces LTM defects. **(d)** *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi*-induced flies show LTM impairment (*amn-RNAi1*: $F_{(2,24)} = 35.70$, $p < 0.0001$, $n \geq 8$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,34)} = 20.22$, $p < 0.0001$, $n \geq 11$). **(e)** In the absence of induction, *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi* flies show normal LTM (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.3926$, $p = 0.6791$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.3627$, $p = 0.6991$, $n = 10$). **(f)** Immediate memory is not affected by *amn* inhibition in the adult MB (*amn-RNAi1*: $F_{(2,23)} = 0.06009$, $p = 0.9418$, $n = 8$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.3195$, $p = 0.7292$, $n = 10$). **(g)** LT-ARM is not affected by *amn* inhibition in the adult MB (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.5645$, $p = 0.5752$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,46)} = 1.709$, $p = 0.1928$, $n \geq 15$). **(h)** MTM analyses with the *Gal80^{ts};VT30559* driver. *Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1* flies show impaired MTM ($F_{(2,35)} = 9.953$, $p = 0.0004$, $n = 12$). In absence of induction, *Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1* flies show normal memory ($F_{(2,35)} = 2.547$, $p = 0.936$, $n = 12$).

Figure 4

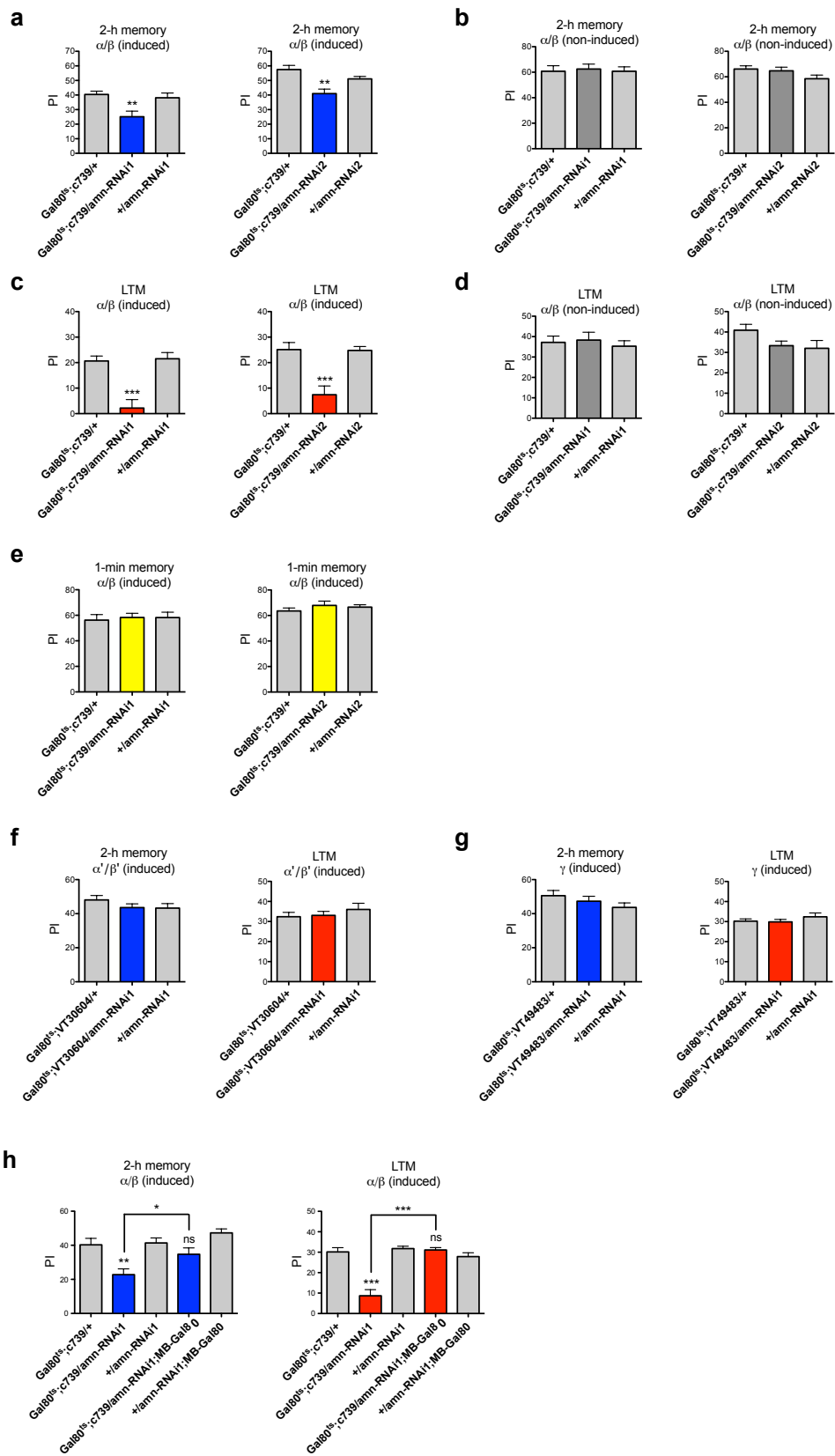


Figure 4. Acute inhibition of *amn* expression in adult α/β neurons leads to memory defects.

(a,b) *amn* expression in adult α/β neurons is required for MTM. (a) After induction, *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi* flies show lower MTM scores than genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 6.600$, $p = 0.0046$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,42)} = 10.17$, $p = 0.0003$, $n \geq 14$). (b) In absence of induction, *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi* flies show normal MTM (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.06366$, $p = 0.9385$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 2.141$, $p = 0.1371$, $n = 10$). (c,d) *amn* expression in the adult α/β neurons is required for LTM. (c) *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi*-induced flies show LTM deficits (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 16.56$, $p < 0.0001$, $n \geq 9$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 13.88$, $p < 0.0001$, $n = 10$). (d) In absence of induction, *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi* flies show normal LTM (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.2201$, $p = 0.8039$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 2.450$, $p = 0.1053$, $n = 10$). (e) *amn* expression is not required in adult α/β neurons for immediate memory. *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi* induced flies show similar scores to genetic controls (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.08728$, $p = 0.9167$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.7192$, $p = 0.4962$, $n = 10$). (f) *amn* expression in adult α'/β' neurons is not required for MTM nor LTM. After induction *Gal80^{ts};VT30604/amn-RNAi1* flies show normal MTM ($F_{(2,35)} = 1.175$, $p = 0.3214$, $n = 12$) and normal LTM ($F_{(2,38)} = 0.6022$, $p = 0.5530$, $n = 13$). (g) *amn* expression in adult γ neurons is not required for MTM nor LTM. After induction *Gal80^{ts};VT49483/amn-RNAi1* flies show normal MTM ($F_{(2,35)} = 1.463$, $p = 0.2461$, $n = 12$) and normal LTM ($F_{(2,38)} = 0.8562$, $p = 0.4332$, $n = 13$). (h) Intersectional analyses. *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1*-induced flies show MTM and LTM deficits whereas *Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1;MB-Gal80*-induced flies show normal MTM and LTM (MTM: $F_{(4,72)} = 7.672$, $p < 0.0001$, $n \geq 14$; LTM: $F_{(4,59)} = 24.12$, $p < 0.0001$, $n = 12$).

Figure 5

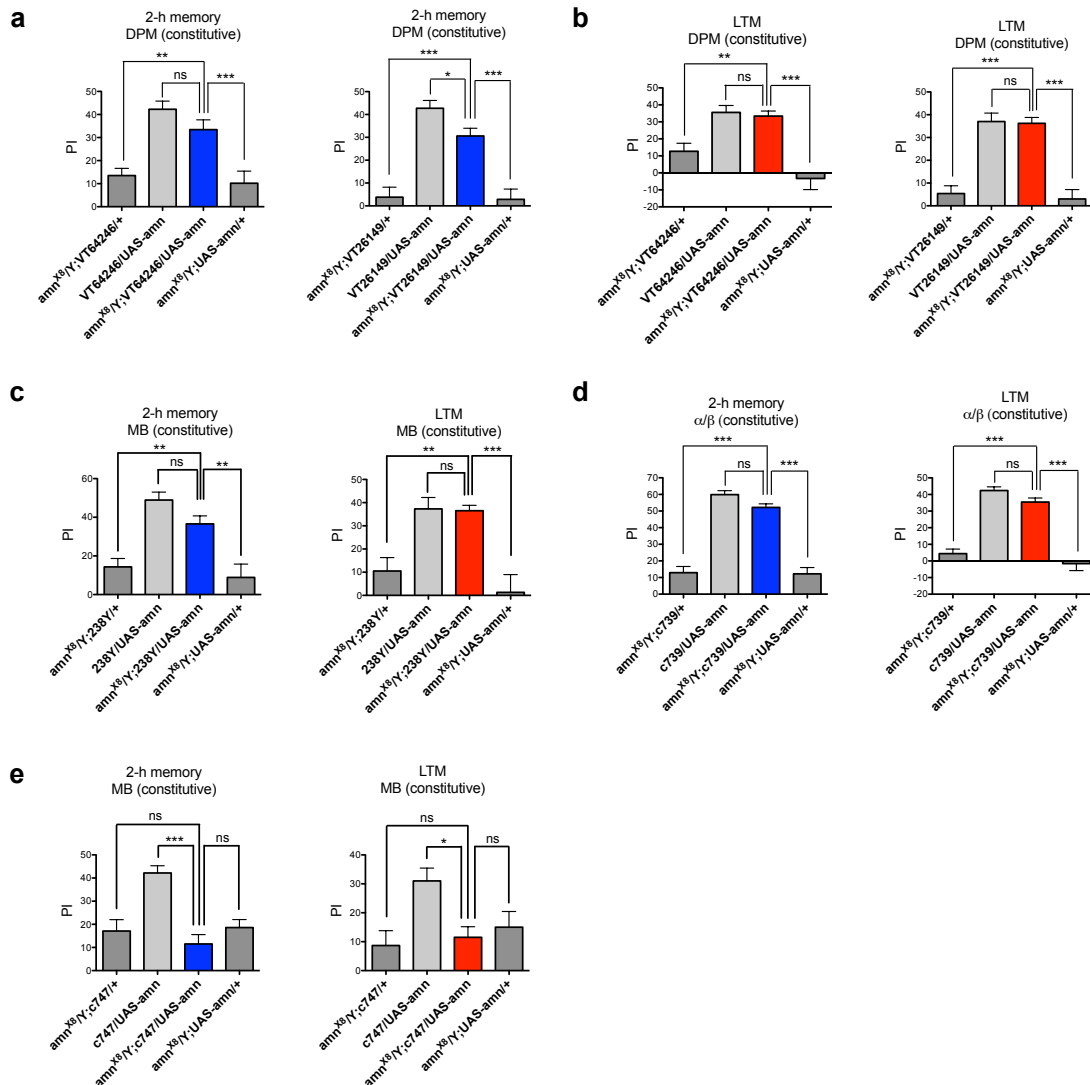


Figure 5. Expression of the wild-type *amn* gene in either DPM or MB neurons of *amn^{X8}* mutant flies rescues their memory deficits.

(a,b) *amn* expression in DPM neurons rescues *amn^{X8}* memory defects. **(a)** MTM analyses. *amn^{X8}/Y* flies expressing *amn* in DPM neurons with either the *VT64246* or the *VT26149* driver show higher MTM scores than their *amn^{X8}/Y* genetic controls (*VT64246*: $F_{(3,57)} = 13.79$, $p < 0.0001$, $n \geq 13$; *VT26149*: $F_{(3,59)} = 25.24$, $p < 0.0001$, $n = 15$). *amn^{X8}/Y;VT64246/UAS-amn* flies show similar MTM scores to normal flies expressing *amn* in DPM neurons, while *amn^{X8}/Y;VT26149/UAS-amn* flies show slightly lower MTM scores than *UAS-amn/VT26149* control flies. **(b)** LTM analyses. *amn^{X8}/Y* flies expressing *amn* in DPM neurons with either the

VT64246 or the *VT26149* driver show higher LTM scores than their *amn^{X8}/Y* genetic controls and similar LTM scores to normal flies expressing *amn* in DPM neurons (*VT64246*: $F_{(3,48)} = 15.76, p < 0.0001, n \geq 11$; *VT26149*: $F_{(3,49)} = 29.28, p < 0.0001, n \geq 12$). **(c,d)** *amn* expression in the MB of *amn^{X8}* mutant flies rescues their memory deficits. **(c)** *amn^{X8}/Y* flies expressing *amn* in the MB show higher MTM and LTM scores than their *amn^{X8}/Y* genetic controls and similar MTM and LTM scores to wild-type flies expressing *amn* in the MB (MTM: $F_{(3,39)} = 14.14, p < 0.0001, n = 10$; LTM: $F_{(3,39)} = 10.94, p < 0.0001, n = 10$). **(d)** *amn^{X8}/Y* flies expressing *amn* in the α/β KC display higher MTM and LTM scores than their *amn^{X8}/Y* genetic controls and similar MTM and LTM scores to wild-type flies expressing *amn* in the α/β KC (MTM: $F_{(3,59)} = 66.52, p < 0.0001, n = 15$; LTM: $F_{(3,59)} = 53.87, p < 0.0001, n = 15$). **(e)** *c747* GAL4-driven *amn* expression does not rescue memory deficits of *amn^{X8}* mutant flies. *amn^{X8}/Y;c747/UAS-amn* flies show similar MTM and LTM scores to *amn^{X8}/Y* genotypes (MTM: $F_{(3,39)} = 11.83, p < 0.0001, n = 10$; LTM: $F_{(3,23)} = 4.449, p < 0.0150, n = 6$).

Figure 6

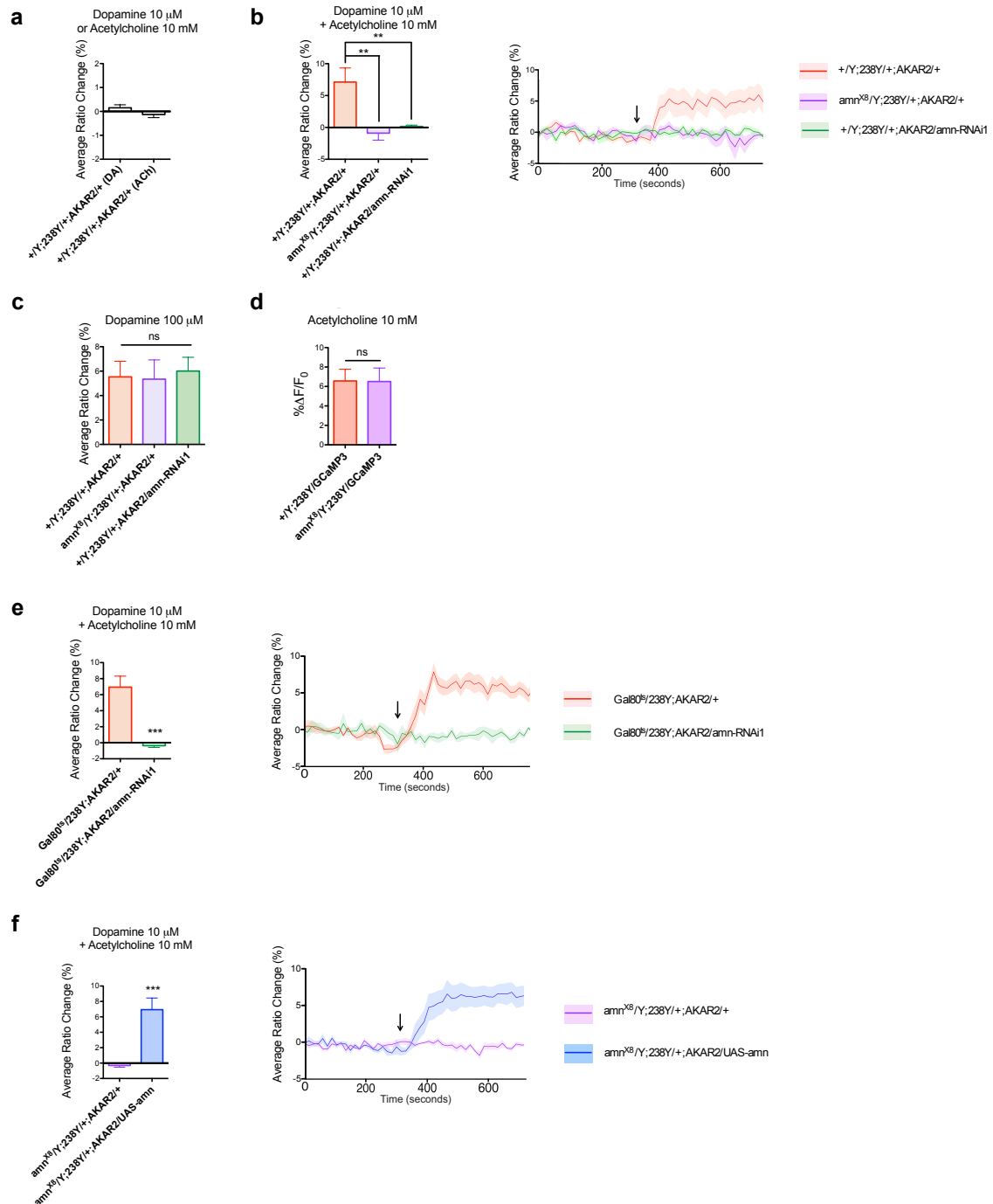
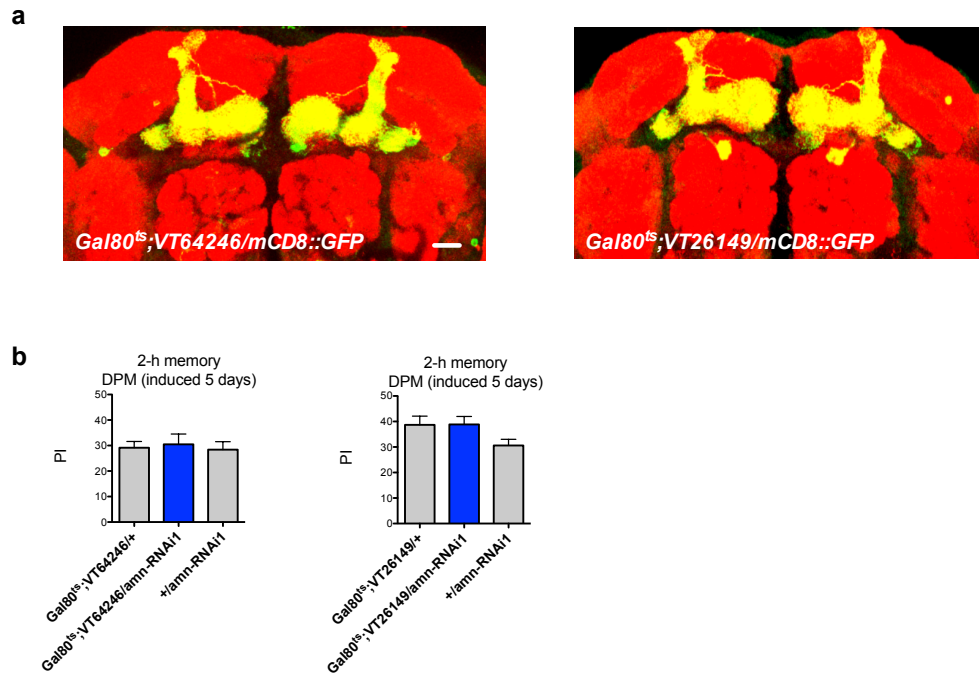


Figure 6. PKA activation in MB vertical lobes after coincidence detection is abolished in *amn*-deficient flies.

The PKA AKAR2 FRET probe or the calcium GCaMP3 probe is expressed in the MB with the 238Y driver. **(a)** Bath application of either dopamine (DA, 10 μ M) or acetylcholine (ACh, 10 mM) does not induce PKA activation in vertical lobes. **(b)** PKA activates upon co-

stimulation with dopamine and acetylcholine, and *amn* deficiency prevents coincidence detection. Mean FRET ratio changes in the vertical lobe are shown in response to co-application of dopamine and acetylcholine ($F_{(2,29)} = 6.501$, $p = 0.0050$, $n = 10$). Grouped time-course of FRET ratios. Graphs were produced using the same data as for the bar graph. Arrow indicates time of neurotransmitter application. (c) Dopamine application at high concentration induces normal PKA activation in *amn*-mutant flies. Mean FRET ratio changes in the vertical lobe are shown in response to dopamine application (100 μ M). *amn*^{X8}/Y;238Y/+;AKAR2/+ and +/Y;238Y/+;AKAR2/*amn-RNAi* flies show similar FRET ratios to +/Y;238Y/+;AKAR2/+ control flies ($F_{(2,27)} = 0.7385$, $p = 0.4880$, $n = 8$). (d) Acetylcholine application at high concentration induces normal calcium response in *amn*-mutant flies. Mean ratio changes in vertical lobes are shown in response to acetylcholine application (10 mM). *amn*^{X8}/Y;238Y/+;GCaMP3/+ flies show similar ratios to +/Y;238Y/+;GCaMP3/+ control flies (t test, $p = 0.9740$, $n = 8$). (e) Acute inhibition of *amn* expression in the adult MB prevents coincidence detection. Mean FRET ratio changes in the vertical lobe are shown in response to co-application of dopamine and acetylcholine (t test, $p = 0.0001$, $n = 8$). Grouped time-course of FRET ratios. Graphs were produced using the same data as for the bar graph. Arrow indicates time of neurotransmitter application. (f) *amn* expression in the MB of *amn*^{X8} mutant flies restores coincidence detection. Mean FRET ratio changes in the vertical lobe are shown in response to paired application of dopamine and acetylcholine (t test, $p = 0.0004$, $n \geq 8$). Grouped time-course of FRET ratios. Graphs were produced using the same data as for the bar graph. Arrow indicates time of neurotransmitter application.

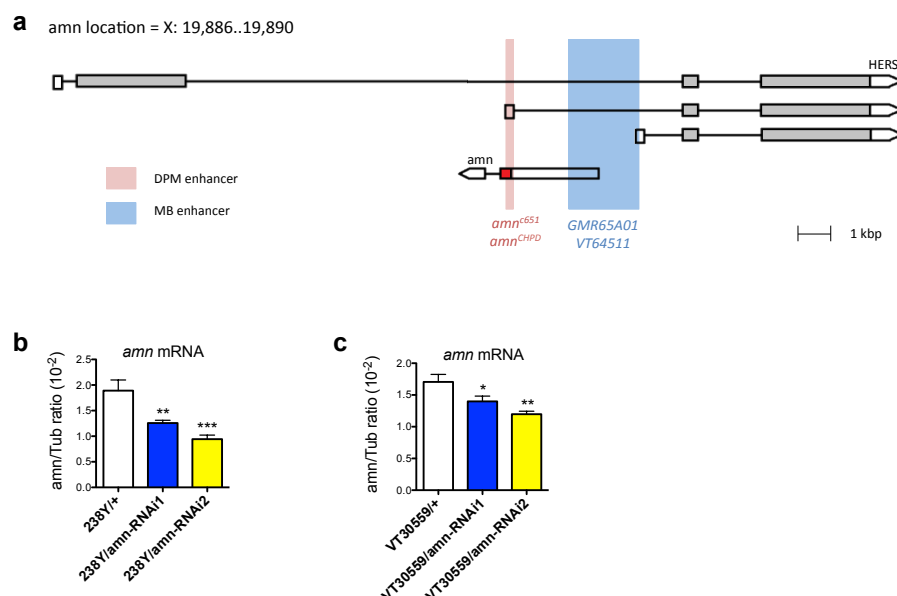
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Analysis of *amn* expression in DPM neurons

(a) Expression pattern of the two DPM-specific drivers used in this study. *Gal80^{ts};VT64246/ mCD8::GFP* and *Gal80^{ts};VT26149/mCD8::GFP* flies were induced for 3 days at 30°C. Dissected brains were used for immunostaining (green, mCD8::GFP). (b) Acute inhibition of *amn* expression in DPM neurons does not impact MTM after 5 days of RNAi induction. *Gal80^{ts};VT64246/amn-RNAi* and *Gal80^{ts};VT26149/amn-RNAi* flies show similar MTM scores to the genetic controls (*Gal80^{ts};VT64246/amn-RNAi*: $F_{(2,38)} = 0.1027$, $p = 0.9027$, $n = 8$; *Gal80^{ts};VT26149/amn-RNAi*: $F_{(2,38)} = 2.431$, $p = 0.1023$, $n = 8$).

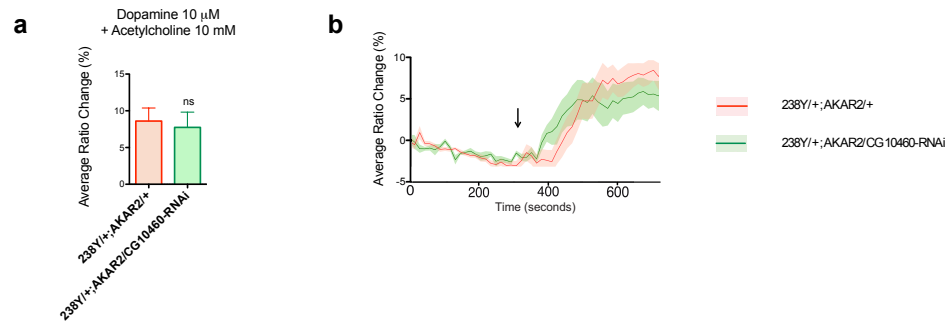
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Analysis of *amn* pattern of expression

(a) Schematic localization of the *amn* transcript with Gal4 insertions (*amn*⁶⁵¹ and *amn*^{CHPD}), and sequences inserted upstream of Gal4 (*GMR65A01* and *VT64511*). Gal4 inserted in a region located at the beginning of the *amn* coding sequence (red box) lead to expression in DPM neurons (*amn*⁶⁵¹, ¹⁷ and www.fly-trap.org/html/enhancer/c651/index.html]; and *amn*^{CHPD}, ¹⁷). A short fragment of genomic DNA covering a region upstream of the *amn* transcript lead to Gal4 expression in the MB α/β neurons (*GMR65A01*, Flybase, <http://flyweb.janelia.org/cgi-bin/flew.cgi>). Similarly, the Vienna Tile *VT64511* covering a region upstream and at the beginning of the *amn* transcript leads to Gal4 expression in the MB α/β neurons (Vienna Drosophila Resource Center, Austria, <http://brainbase.imp.ac.at/bbweb/#2?ent=11&id=10379>). (b,c) qPCR analyses of *amn* expression levels. 238Y and VT30559/*amn*-RNAi flies were raised at 25°C before total RNA extraction from 50 female heads using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Samples were reverse-transcribed with oligo(dT)20 primers using the SuperScript III First-Strand kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions (oligo(dT) for *amn* transcript: Forward: 5'-ACATGCGCAGTTTTTGTGT-3'; Reward: 5'-AACAGTAATACGCACTGCAACG-3'). Level of the target cDNA was compared against level of α -Tub84B (*CG1913*) cDNA, which was used as a reference. Amplification was performed using a LightCycler 480 (Roche) and the SYBR Green I Master mix (Roche). Reactions were carried out in triplicate. Specificity and size of amplification products were assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis, respectively. Expression relative to reference is expressed as a ratio ($2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the crossing point). (b) Each bar corresponds to 6 measures from 3 independent experiments ($F_{(2,17)} = 13.16$, $p = 0.0005$, $n = 6$). 238Y/*amn*-RNAi1 and 238Y/*amn*-RNAi2 show 33% and 50% decrease in *amn* mRNA compared to the control 238Y/+. (c) Each bar corresponds to 8 measures from 4 independent experiments ($F_{(2,23)} = 8.522$, $p = 0.002$, $n = 8$). VT30559/*amn*-RNAi1 and VT30559/*amn*-RNAi2 show 18% and 30% decrease in *amn* mRNA compared to the control VT30559/+.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Unspecific RNAi expression does not alter PKA activation in MB α lobe after coincidence detection

The PKA AKAR2 FRET probe is expressed in the MB with the *238Y* GAL4-driver. *+Y;238Y/+;AKAR2/CG10460-RNAi* display PKA activation upon co-stimulation with dopamine and acetylcholine similar to control flies. **(a)** Mean FRET ratio changes in the α lobe are shown in response to paired application of dopamine and acetylcholine (*t-test*, $p = 0.7544$, $n = 8$). **(b)** Grouped time course of FRET ratios are shown. Graphs were made using the same data as for the bar graph. The arrow indicates time of neurotransmitter application.

Supplementary Tables

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>VT64246/+</i>	71.80 ± 4.36	58.30 ± 2.77	60.50 ± 5.15
<i>VT64246/amn-RNAi1</i>	65.30 ± 2.87	73.30 ± 4.60	59.80 ± 4.78
<i>+/amn-RNAi1</i>	69.70 ± 2.83	61.90 ± 4.53	51.20 ± 4.01
<i>VT64246/+</i>	69.50 ± 4.11	59.80 ± 4.45	67.70 ± 4.39
<i>VT64246/amn-RNAi2</i>	67.20 ± 3.65	60.40 ± 3.35	63.60 ± 5.19
<i>+/amn-RNAi2</i>	74.00 ± 4.39	58.40 ± 5.31	62.20 ± 5.10

Supplementary Table 1. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing amn-RNAi in DPM neurons

Data are shown as means ± SEM. *VT64246/amn-RNAi1* and *VT64246/amn-RNAi2* flies exhibit normal shock reactivity (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.9378$, $p = 0.4059$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.7252$, $p = 0.4934$, $n = 10$) and normal olfactory acuity for octanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 3.726$, $p = 0.0372$, $n = 10$, post-hoc Newman-Keuls test, *VT64246/amn-RNAi* vs *VT64246/+* * $p < 0.05$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.05341$, $p = 0.9481$, $n = 10$) and methylcyclohexanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 1.230$, $p = 0.3081$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.3516$, $p = 0.7067$, $n = 10$).

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};238Y/+</i>	79.75 ± 3.92	75.10 ± 3.79	50.70 ± 0.92
<i>Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi1</i>	73.13 ± 3.83	70.50 ± 3.09	57.00 ± 4.10
<i>+/amn-RNAi1</i>	72.00 ± 4.67	73.50 ± 3.62	52.00 ± 1.65
<i>Gal80^{ts};238Y/+</i>	83.70 ± 4.42	53.50 ± 5.43	55.50 ± 6.57
<i>Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi2</i>	81.20 ± 2.84	58.50 ± 6.82	46.10 ± 4.15
<i>+/amn-RNAi2</i>	71.40 ± 1.82	44.20 ± 4.59	49.40 ± 2.90
<i>Gal80^{ts};VT30559/+</i>	74.88 ± 5.11	69.38 ± 4.56	66.25 ± 7.01
<i>Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1</i>	77.38 ± 2.10	66.38 ± 3.82	70.88 ± 5.27
<i>+/amn-RNAi1</i>	77.88 ± 3.74	60.88 ± 3.57	55.00 ± 4.83

Supplementary Table 2. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing *amn-RNAi* in adult MB neurons

Data are shown as means ± SEM. *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi1* and *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi2* induced flies exhibit normal shock reactivity (*amn-RNAi1*: $F_{(2,23)} = 1.015$, $p = 0.3795$, $n = 8$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.9917$, $p = 0.3840$, $n = 10$) and normal olfactory acuity for octanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.4422$, $p = 0.6472$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 4.113$, $p = 0.0276$, $n = 10$) and methylcyclohexanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 1.627$, $p = 0.2152$, $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 1.628$, $p = 0.2150$, $n = 10$). *Gal80^{ts};VT30559/amn-RNAi1* induced flies exhibit normal shock reactivity ($F_{(2,23)} = 0.1736$, $p = 0.8418$, $n = 8$) and normal olfactory acuity for octanol ($F_{(2,23)} = 1.156$, $p = 0.3340$, $n = 8$) and methylcyclohexanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,23)} = 1.993$, $p = 0.1612$, $n = 8$).

Genotype	Shock reactivity	Olfactory acuity	
		Octanol	Methylcyclohexanol
<i>Gal80^{ts};c739/+</i>	74.25 ± 4.86	52.70 ± 3.82	45.40 ± 3.78
<i>Gal80^{ts};c739/amn-RNAi1</i>	78.75 ± 4.46	56.80 ± 4.96	48.30 ± 4.84
<i>+/amn-RNAi1</i>	70.25 ± 5.36	59.50 ± 6.58	44.50 ± 3.55
<i>Gal80^{ts};c739/+</i>	70.60 ± 5.56	52.20 ± 4.36	48.80 ± 4.67
<i>Gal80^{ts};c739/amn-RNAi2</i>	69.10 ± 4.78	57.60 ± 5.12	56.30 ± 3.92
<i>+/amn-RNAi2</i>	68.50 ± 4.14	60.90 ± 5.19	49.80 ± 5.33

Supplementary Table 3. Shock reactivity and olfactory acuity of flies expressing amn-RNAi in adult α/β neurons

Data are shown as means ± SEM. *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi1* and *Gal80^{ts};238Y/amn-RNAi2* induced flies exhibit normal shock reactivity (*amn-RNAi1*: $F_{(2,23)} = 0.7515$, $p = 0.4839$, $n = 8$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.04958$, $p = 0.9517$, $n = 10$) and normal olfactory acuity for octanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.4266$, $p = 0.6571$, $n = 10$; $n = 10$; *amn-RNAi2*: $F_{(2,29)} = 0.7444$, $p = 0.4845$, $n = 10$) and methylcyclohexanol (*amn-RNAi1*: $F_{(2,29)} = 0.2355$, $p = 0.7918$, $n = 10$; *amn-RNAi2* $F_{(2,29)} = 0.7585$, $p = 0.4781$, $n = 10$).

Résultats supplémentaires : sauvetage inductible des mutants amn^{x8}

Nous avons montré dans cet article que les défauts de MTM et de LTM des mutants amn pouvaient être sauvés en exprimant constitutivement le gène amn sauvage dans les MB. D'autres études préalables avaient aussi montré que les phénotypes de mutants $nul\ amn$ pouvaient être sauvés par l'expression constitutive du gène amn sauvage. DeZazzo et al. (1999) avaient pour cela utilisé un Gal4 exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *amnesiac* (le mutant amn^{28A} possède un élément P codant un Gal4, situé dans le gène *amnesiac*) alors que Waddell et al. (2000) ont utilisé le driver *c316*, considéré à l'époque comme spécifique des neurones DPM, mais marquant aussi d'autres structures dont les MB (Wu et al., 2011). Par ailleurs, DeZazzo et al. (1999) avaient aussi essayé de sauver les défauts de mémoire du mutant amn^{x8} en exprimant le gène amn sauvage chez l'adulte. Pour cela, les auteurs ont utilisé une séquence promotrice *hsp* activée par une augmentation drastique de la température. Les auteurs n'ont pu observer de sauvetage du défaut de MTM, ce qui les a amenés à poser l'hypothèse que le défaut de mémoire des mutants *amnesiac* serait en fait la cause d'un défaut de développement.

Nous avons voulu déterminer s'il était possible de sauver le défaut de mémoire du mutant amn^{x8} en restaurant l'expression du gène *amnesiac* spécifiquement dans les neurones α/β adultes. De manière similaire au résultat observé par DeZazzo et al. (1999), nous n'avons pas pu observer de sauvetage des mâles amn^{x8}/Y par l'expression dans les neurones α/β adultes du gène *amnesiac* (Figure 42).

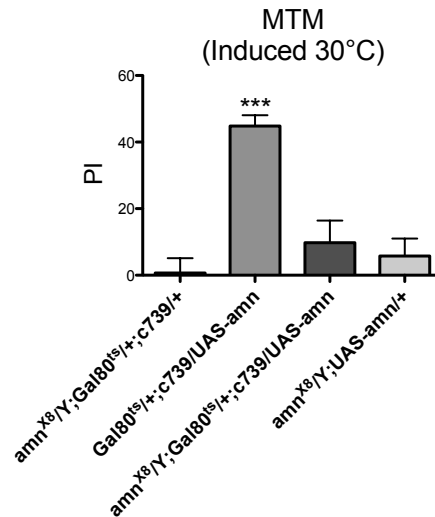


Figure 42 : L'expression dans les neurones α/β adultes d'amnesiac ne permet pas de sauver le défaut de MTM des mâles *amn^{X8}/Y*.

Les drosophiles *amn^{X8}/Y;Gal80^{ts}/+;c739/UAS-amn* présentent une MTM similaire à celle de leurs contrôles *amn^{X8}/Y* ($F_{(3,48)} = 15.74$, $p < 0.0001$, $n \geq 12$) et inférieure à celle des drosophiles sauvages exprimant amnesiac dans les neurones α/β (test post-hoc Newman-Keuls, *amn^{X8}/Y;Gal80^{ts}/+;c739/UAS-amn* vs *Gal80^{ts}/+;c739/UAS-amn* *** $p < 0.001$).

Contrairement à eux des mâles *amn^{X8}/Y*, les défauts de MTM et de LTM des drosophiles femelles *amn^{X8}/+* sont sauvés par l'expression d'amnesiac dans les neurones α/β chez l'adulte (Figure 43).

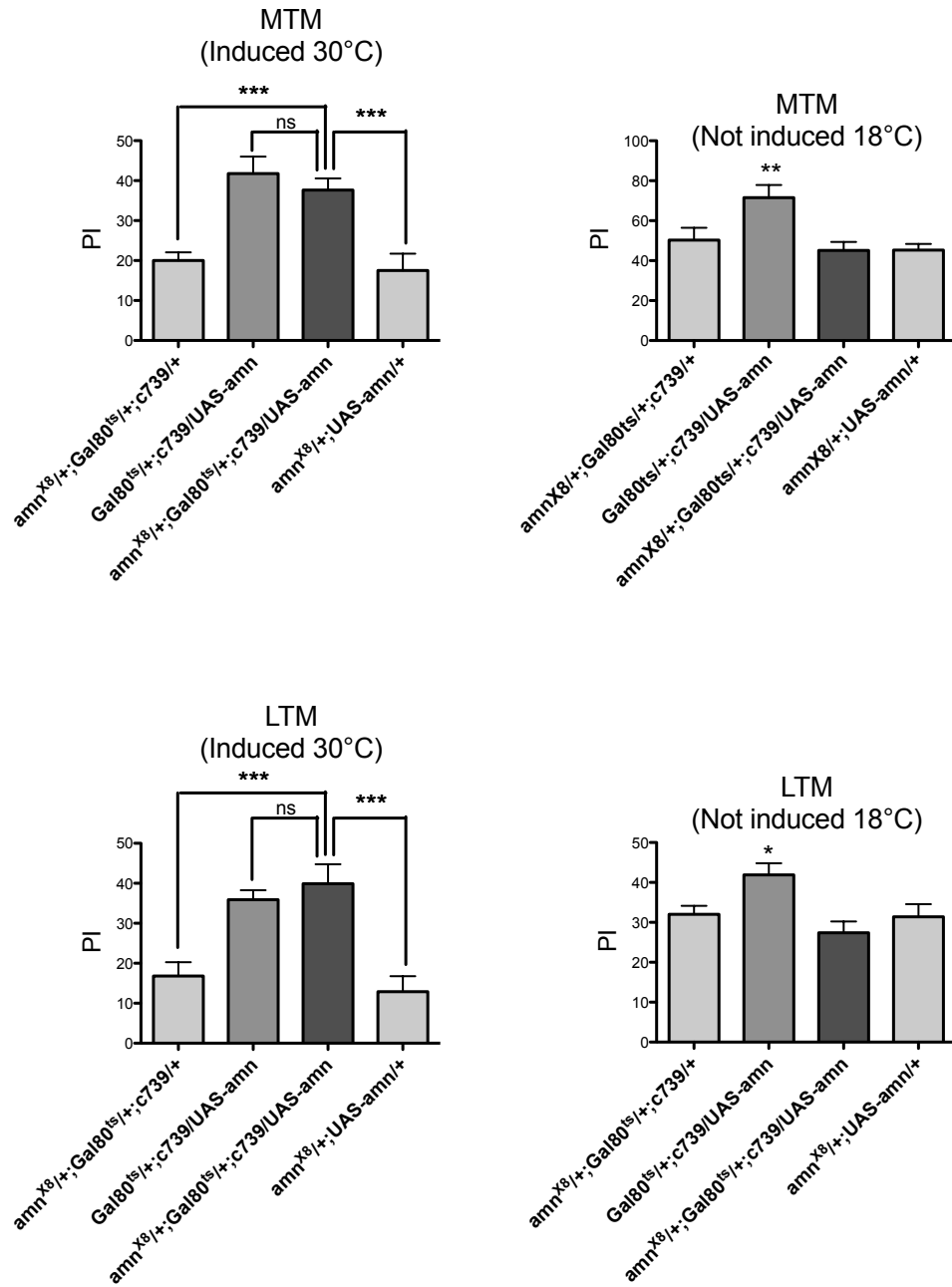


Figure 43 : L'expression d'amnesiac dans les neurones α/β adultes permet de sauver le défaut de MTM et de LTM des femelles *amnX8/+*.

A. Les drosophiles *amnX8/+* exprimant *amn* dans les neurones α/β adultes présentent des scores de MTM plus élevés que leurs contrôles génétiques *amnX8/+*, et des scores similaires à ceux des drosophiles sauvages exprimant *amn* dans les neurones α/β ($F_{(3,55)} = 12.38$, $p < 0.0001$, $n = 14$). Sans induction, les drosophiles *amnX8/+;Gal80ts/+;c739/UAS-amn* présentent des scores de MTM similaires à ceux de leurs contrôles génétiques *amnX8/+* ($F_{(3,31)} = 5.876$, $p = 0.0030$, $n = 8$). B. Les drosophiles *amnX8/+* exprimant *amn* dans les neurones α/β adultes présentent des scores de LTM plus élevés que leurs contrôles génétiques *amnX8/+* et des scores similaires à ceux des drosophiles sauvages exprimant *amn* dans les

neurones α/β ($F_{(3,39)} = 12.89$, $p < 0.0001$, $n = 10$). Sans induction, les drosophiles $amn^{X8/+};Gal80^{ts}/+;c739/UAS-amn$ présentent des scores de LTM similaires à ceux de leurs contrôles génétiques $amn^{X8}/+$ ($F_{(3,39)} = 4.901$, $p = 0.0059$, $n = 10$).

L'absence de sauvetage des mâles hémizygotes amn^{X8}/Y peut aisément s'expliquer par la présence de défauts de développement des neurones DPM (observés et décrits dans notre article). En effet, de tels défauts ne pourraient être sauvés par l'expression d' amn chez l'adulte dans les MB. En conclusion il y aurait deux causes aux phénotypes de mémoire observés chez des mouches amn^{X8}/Y : un défaut de développement des neurones DPM qui sont requis pour la formation de la MTM et de la LTM, et un défaut fonctionnel dû à l'absence d'amnesiac dans les MB adultes.

Le sauvetage observé lorsque le gène amn est exprimé dans les MB de femelles hétérozygotes $amn^{X8}/+$ adultes pourrait s'expliquer de la manière suivante :

- La présence de 50% de protéine amn chez les mouches $amn^{X8}/+$, par rapport à un génotype sauvage, pourrait être suffisante pour un développement normal des neurones DPM, comme cela a pu être observé avec des drosophiles $App^l^d/+$, hétérozygotes pour la délétion du gène APPL (Soldano et al., 2013).

- En revanche, la réduction de 50% du niveau de protéine amn serait délétère pour la mémoire. Ainsi, l'expression du gène amnesiac dans les MB adultes permettrait de restaurer une mémoire normale.

	MB	DPM
amn^{X8}/Y	Défaut détection de coïncidence	Défaut de développement
$amn^{X8}/Y;UAS-amn$ constitutif	Sauvetage détection de coïncidence	Sauvetage développement
$amn^{X8}/Y;UAS-amn$ inductible	Sauvetage détection de coïncidence ?	Pas de sauvetage ?
$amn^{X8}/+$	Défaut détection de coïncidence	Développement normal
$amn^{X8}/+;UAS-amn$ constitutif	Sauvetage détection de coïncidence	Développement normal
$amn^{X8}/+;UAS-amn$ inductible	Sauvetage détection de coïncidence	Développement normal

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des phénotypes observés dans les MB et les neurones DPM lors des sauvetages des mutants amn^{X8}/Y et $amn^{X8}/+$ par l'expression d' amn .

En conclusion, nous proposons que les défauts de mémoire observés chez les mouches $\text{amn}^{\text{X8}}/\text{Y}$ proviennent à la fois d'un défaut de développement, a minima des neurones DPM, possiblement dus au peptide homologue à la GH, et d'un défaut de détection de coïncidence, causé par l'absence d' amn dans les neurones α/β chez l'adulte (Tableau 1).

Discussion

I. Rôle des néprilysines dans la mémoire

Nous avons montré que les 4 néprilysines exprimées dans le cerveau jouent un rôle dans la MTM et la LTM (Figure 44). L'expression de Nep1 est requise dans les neurones α/β des MB pour la formation de la MTM et de la LTM. Les trois autres néprilysines, Nep2, 3 et 4, semblent avoir un rôle dans la formation de la LTM dans ces neurones mais avec une fonction redondante. Dans les neurones DPM, les 4 néprilysines sont impliquées dans la MTM, alors que pour la LTM, nous n'avons pu montrer l'implication que des Nep1, 3 et 4.

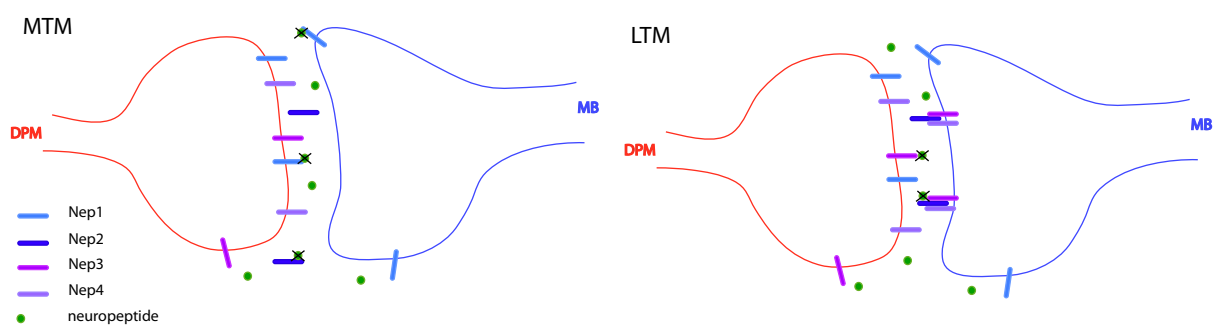


Figure 44 : Schéma du rôle des Nep1-4 dans la MTM et la LTM à partir des résultats obtenus.

Pour la formation de la MTM, Nep1 est requise dans les MB (indiqués en bleu) et les DPM (indiqués en rouge), alors que les Nep2, 3 et 4 ne semblent requises que dans les neurones DPM. Pour la formation de la LTM : dans les MB, Nep1 est essentielle alors que Nep2, Nep3 et Nep4 ont une fonction redondante ; et dans les neurones DPM, Nep1, 3 et 4 sont requises.

1) Localisation des néprilysines à la synapse

Nos résultats soulignent les liens fonctionnels entre les neurones DPM et les MB pour la formation de la mémoire. Une hypothèse a été proposée pour expliquer la fonction de ces liens : les interactions entre les neurones DPM et les MB permettraient la mise en place d'une boucle de régulation qui serait responsable de la maintenance de l'activité électrique nécessaire à la formation de la MTM (Keene et al., 2004). Les lobes des MB, sites de projection des neurones DPM, sont constitués des axones des cellules de Kenyon, et devraient donc être présynaptiques. Néanmoins, il a été montré qu'ils

pouvaient recevoir des informations d'autres neurones, ce qui indique que des synapses postsynaptiques y sont aussi présentes (Keene et al., 2006; Pitman et al., 2011; Wu et al., 2013; Haynes et al., 2015). Concernant les neurones DPM, il a déjà été montré que les projections sur les MB sont des neurites qui peuvent recevoir et transmettre des informations (Keene et al., 2006; Wu et al., 2013; Haynes et al., 2015). En revanche, il n'est pas connu si ces neurites sont spécialisés : par exemple si les synapses pré- ou postsynaptiques sont concentrées au niveau d'un lobe en particulier ou si les synapses pré- et postsynaptiques sont localisées aléatoirement.

Il serait donc intéressant de déterminer si le rôle des néprilysines est présynaptique ou postsynaptique. En effet, chez les mammifères, la littérature rapporte des informations contradictoires sur la localisation des néprilysines : pour certains, elles sont présynaptiques (Iwata et al., 2002; Baranello et al., 2015), pour d'autres postsynaptiques (Lasher et al., 1990) ou enfin les deux (Barnes et al., 1992; Turner et al., 2001; Nalivaeva et al., 2012b). Etant donné que les néprilysines sont détectées dans des vésicules synaptiques (Kakiya et al., 2012), il est aussi possible que ces vésicules soient véhiculées à la membrane pour augmenter la quantité de néprilysines disponibles lors de l'activation d'une synapse présynaptique.

2) Importance de la dégradation de neuropeptides pour la formation de la mémoire

Les résultats obtenus indiquent la nécessité de la dégradation de neuropeptides impliqués dans la mémoire dans le milieu extracellulaire. Ces neuropeptides pourraient provenir des MB eux-mêmes ou des nombreuses afférences à ces neurones, et agir sur les MB ou des neurones adjacents. Les DPM pourraient jouer un rôle en arrêtant l'activation des voies de signalisation nécessaires à la formation de la MTM et de la LTM, et en dégradant les neuropeptides présents près des lobes des MB. En effet, il a été montré que la suractivité d'une voie de signalisation produisait un effet négatif et/ou inverse (Arundine and Tymianski, 2003; Mittal et al., 2009; Rodriguez-Rodriguez et al., 2013; Bertacchini et al., 2015).

De nombreux peptides pourraient être clivés par les néprilysines : amnesiac, PDF, sNPF, dNPF, peptides amyloïdes... Ces cibles pourraient soit être dégradées, pour stopper de l'activation d'une voie de signalisation, soit clivées pour produire une forme active ou une forme ayant une affinité spécifique pour un type de récepteur (Gourlet et al., 1997), ce qui permettrait d'activer spécifiquement une voie de signalisation.

Déterminer chez la drosophile la ou les cibles de chaque néprilysine serait particulièrement important pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliqués dans la formation des formes de mémoires labiles. Dans cette optique, nous allons mettre en place en collaboration avec une plateforme de protéomique (Plateforme Protéomique structurale et fonctionnelle / Spectrométrie de masse de l'Institut Jacques-Monod) pour essayer de déterminer quelles pourraient être les cibles des néprilysines : les peptides présents en plus grande quantité dans les cerveaux de drosophiles exprimant un RNAi contre l'une des néprilysines que dans les cerveaux de drosophiles contrôles pourraient être des cibles potentielles.

3) Rôle de Nep1 dans les neurones DPM : dégradation des peptides dA β

Dans notre 2^e article, nous avons montré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre Nep1 et les peptides dA β artificiels et endogènes exprimés dans les neurones DPM.

L'interaction que nous avons mise en évidence avec la co-surexpression de la β -sécrétase dBACE et d'APPL, permettant l'augmentation de la production des peptides endogènes (Carmin-Simmen et al., 2009), est similaire à celle observée avec l'expression ectopique du peptide dA β . Ainsi nos résultats montrent que Nep1 interagit avec les peptides dA β endogènes, produits par la drosophile à partir de leur précurseur, suggérant que cette interaction fonctionnelle est physiologique.

Notre étude montre que cette interaction est dépendante de l'activité catalytique de Nep1, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle Nep1 dégrade les peptides dA β et que cette dégradation est importante pour la mémoire. Jusqu'à présent, à part dans le cas où dBACE et APPL sont surexprimés, il n'a jamais été possible d'établir la présence de peptides A β chez la drosophile. Il est donc probable que les peptides A β soient présents à de très faibles concentrations, et qu'ils puissent jouer un rôle physiologique dans la mémoire chez la drosophile, comme cela a été suggéré chez les mammifères (Garcia-Osta and Alberini, 2009; Puzzo et al., 2011). Cela indiquerait que le rôle physiologique des peptides A β est conservé entre les espèces.

En effet, chez les mammifères, A β est produit physiologiquement dans des cerveaux sains lors de l'activité neuronale, et est nécessaire pour la plasticité synaptique et la mémoire. Il a été suggéré que l'altération de la boucle de régulation négative entre A β et

son/ses récepteurs physiologiques pourrait jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Puzzo et al., 2015) : lorsque les peptides A β n'arrivent pas à exercer leurs fonctions physiologiques, un mécanisme de régulation se met en place et induit une augmentation compensatoire de leur production, provoquant une accumulation anormale qui mène à une dysfonction synaptique et des troubles de la mémoire. C'est ce que nous observons en forçant la production des peptides endogènes dA β , en surexprimant APPL et dBACE, ainsi qu'en exprimant des peptides dA β ectopiques : dans les deux cas, une accumulation de ces peptides provoque des défauts de mémoire. De plus, l'expression ectopique des peptides dA β dans les neurones DPM ne provoque pas de défaut de MTM alors que la surexpression d'APPL et de dBACE en cause un. Ce résultat montre que le niveau d'expression des peptides artificiels est probablement plus faible que celui atteint lors de la surexpression d'APPL et de dBACE. Si l'expression ectopique de peptides dA β n'est pas suffisamment importante pour provoquer un défaut de MTM, cela renforce l'hypothèse d'un seuil de la quantité de dA β au dessus duquel ces peptides cessent d'exercer leur rôle physiologique : une faible augmentation ne provoquerait pas l'activation du mécanisme de régulation, alors qu'une plus forte la provoquerait.

Il est particulièrement intéressant de noter que l'interaction fonctionnelle entre Nep1 et dA β n'est visible qu'avec la Nep1 exprimée par les neurones DPM. En effet, Nep1 étant strictement membranaire, on peut supposer que seule la Nep1 présente à la membrane des neurones DPM est impliquée dans cette interaction. Selon cette hypothèse, la Nep1 présente à la membrane des neurones DPM au niveau des synapses MB/DPM pourrait dégrader des peptides amyloïdes provenant de l'un ou l'autre, ou les deux structures. Le fait que l'interaction entre Nep1 et les peptides dA β n'ait pu être mise en évidence lorsque l'expression de Nep1 et des peptides dA β est modulée dans les MB, peut aussi poser la question de la localisation de Nep1 dans ces neurones. En effet, il a été démontré que Nep1 est exprimée dans les MB grâce à des expériences d'*in situ* et aux résultats obtenus dans notre 1^{er} article (Sitnik et al., 2014; Turrel et al., 2016) mais il n'a pas pu être montré dans quel compartiment elle est localisée. Les peptides dA β endogènes et artificiels exprimés dans les MB sont probablement sécrétés aux synapses présentes au niveau des lobes des MB. Si Nep1 est exprimée dans les dendrites des MB ou dans le pédoncule, alors il est possible qu'elle ne puisse interagir avec les peptides dA β (Figure 45).

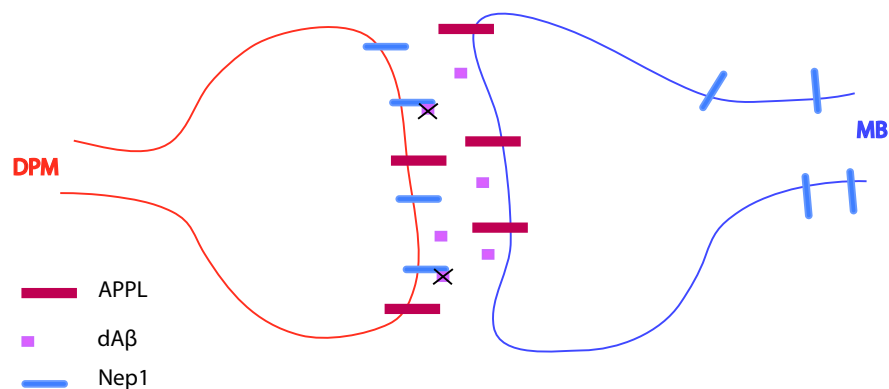


Figure 45 : Schéma illustrant l'hypothèse selon laquelle la Nep1 des MB ne pourrait interagir avec dAβ à cause de sa localisation.

La Nep1 exprimée par les neurones DPM serait à la synapse MB/DPM et pourrait y dégrader les peptides dAβ présents, alors que la Nep1 exprimée par les MB serait adressée à une autre localisation (dendrites, soma...) ce qui empêcherait son interaction avec les peptides amyloïdes.

II. Amnesiac

1) Rôle d'AMN au cours du développement des neurones DPM

Depuis 2000, il est établi que le gène amnesiac est exprimé dans les neurones DPM (Waddell et al., 2000). L'activation des neurones DPM provoquerait la sécrétion du neuropeptide amn par ces mêmes neurones, permettant ainsi la formation de la MTM et de la LTM via l'activation des MB. Dans notre article nous remettons en cause ces résultats. En utilisant des RNAi et des pilotes d'expression spécifiques et inducibles, nous montrons que l'expression d'amn dans les neurones DPM adultes ne semble pas requise pour la formation de la mémoire :

1) L'expression constitutive de deux RNAi distincts dans les neurones DPM provoque des défauts de MTM et de LTM. En revanche, l'expression de ces RNAi dans les neurones DPM adultes ne permet d'altérer ni la MTM ni la LTM.

2) Deux pilotes d'expression distincts des neurones DPM ont été utilisés. Alors que l'un de ces pilotes montre une bonne efficacité après 3 jours d'induction (Turrel et al., 2016), nous n'observons pas de phénotype, y compris après 5 jours d'induction.

3) Nos résultats confirment que s'il est possible de sauver les défauts de mémoire des mutants nuls amn avec une expression constitutive du gène sauvage amn, il n'est pas possible d'observer un sauvetage avec une expression limitée à l'adulte.

L'ensemble de ces données suggère fortement la présence de défauts de développement chez les mutants *amn*. De fait, en exprimant constitutivement un RNAi-*amn* et une GFP membranaire dans les neurones DPM, nous avons observé des défauts de développement des neurones DPM chez l'adulte (Figure 46). Keene et al. (2004) avaient conclu qu'*amn* n'était pas essentiel pour un adressage correct des neurites des neurones DPM vers les lobes des MB, et que par conséquent, le défaut de mémoire des mutants *amn* n'était pas dû à un défaut majeur de développement des neurones DPM. Néanmoins, lorsque l'on observe attentivement la morphologie des neurones DPM de mutants nuls présentés dans leur article (Figure 1 A et B), on constate les mêmes caractéristiques que celles observées lors de notre étude.

Il est intéressant de remarquer que les défauts de mémoire des mutants *amn^{x8}/+*, exprimant 50% du niveau normal d'amnesiac, peuvent être sauvés par une expression inducible du gène sauvage amnesiac. Cela laisserait à penser que ces mutants expriment un niveau d'*amn* suffisant pour assurer un développement normal des neurones DPM, sans que ce niveau soit suffisant pour assurer la formation de la MTM et la LTM (Figure 46). Le seuil d'expression d'*amn* permettant un développement correct des neurones DPM serait donc plus bas que celui permettant la formation de la mémoire.

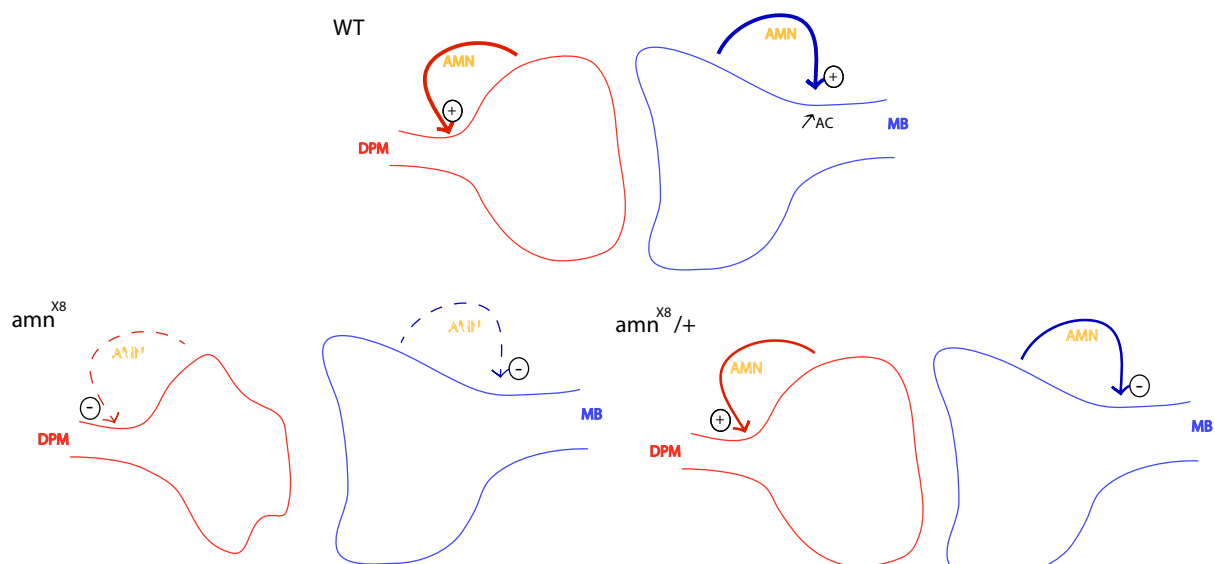


Figure 46 : Schéma récapitulatif du rôle d'amnesiac chez des drosophiles sauvages (WT) et des mutants hémizygotes (*amn^{x8}/Y*) ou hétérozygotes (*amn^{x8}/+*) pour amnesiac.

Chez les WT, pendant le développement, AMN est sécrété par les neurones DPM (flèche rouge) et permet leur développement normal, alors que chez l'adulte, AMN est sécrété par les MB (flèche bleue) et active

l'Adénylate Cyclase (AC) rutabaga requise pour la détection de coïncidence permettant la formation de la MTM. Chez les mutants nuls amn^{x8} , l'absence d' amn provoque un défaut de développement des neurones DPM et la perte de la détection de coïncidence chez l'adulte. Chez les mutants hétérozygotes $amn^{x8}/+$, la quantité résiduelle d'AMN est suffisante pour le bon développement des neurones DPM, mais pas pour assurer la détection de coïncidence dans les MB adultes.

Etant donné que l'expression constitutive d'un RNAi dans les neurones DPM provoque des défauts de mémoire (Figure 47), on peut supposer que les défauts morphologiques empêchent le fonctionnement normal des neurones DPM, et donc la formation des types de mémoire qui en dépendent. En effet, l'expression du RNAi dans les neurones DPM ne devrait pas empêcher l'activation de l'AC dans les MB par l'amnesiac sécrété par les MB : si seule l'activation de l'AC était requise pour la formation de la mémoire, alors les drosophiles exprimant ce RNAi constitutivement dans les neurones DPM devraient avoir une mémoire normale, ce qui n'est pas le cas. Pour analyser si l'expression constitutive du RNAi dans les neurones DPM bloque l'activation de l'AC, il serait possible d'étudier la détection de coïncidence chez des mutants amn^{x8}/Y exprimant amnesiac dans les MB adultes. Chez ces drosophiles, les neurones DPM présenteront un défaut de développement et les MB sécrèteront AMN. Nous avons montré que ces drosophiles présentent un défaut de mémoire (Figure 49C). Si ces drosophiles ne font pas de détection de coïncidence, cela montrerait que le défaut de développement des neurones DPM est suffisant pour empêcher la formation normale de la mémoire, même lorsque l'AC est activée normalement dans les MB.

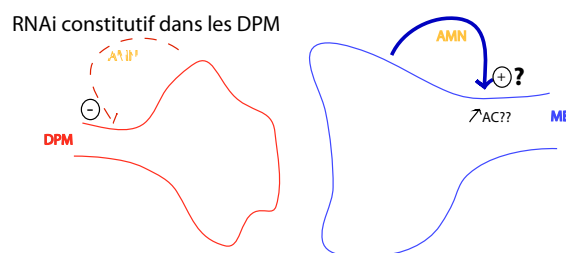


Figure 47 : Schéma récapitulatif des phénotypes observés lors de l'expression constitutive d'un RNAi-amn dans les neurones DPM.

L'expression constitutive d'un RNAi-amn dans les neurones DPM provoque des défauts de développement qui empêchent la formation de la MTM, malgré le fait qu'amnesiac soit correctement exprimé dans les MB.

L'expression d'un RNAi-amn dans les neurones DPM adultes ne provoquant pas de défaut de mémoire (Figure 48), il est possible qu'amnesiac ne soit pas être exprimé dans les neurones DPM adultes et ne soit requis que pour le développement. Pour notre part, nous n'avons pas pu observer d'implication d'amnesiac dans la mémoire dans les neurones DPM adultes, y compris après 5 jours d'induction du RNAi.

Le gène amn codant pour un prépropeptide contenant 3 peptides putatifs, une fonction dans le développement synaptique pourrait aussi bien être due au 1^{er} peptide homologue de la GHRH qu'au 2nd homologue à PACAP: en effet, chez les mammifères les deux peptides ont été impliqués dans le développement, la neurogénèse et la différenciation neuronale (pour revue, Watanabe et al., 2007 pour PACAP ; Moretti et al., 2002; Kiaris et al., 2011 pour la GHRH).

Il est intéressant de noter que les défauts morphologiques des neurones DPM chez les mutants amn ne provoquent pas de défaut d'apprentissage ni de ARM (Lee et al., 2011) alors qu'ils semblent avoir un impact sur la formation de la MTM et de la LTM. Cette observation pousserait à penser que les neurones DPM ne sont pas impliqués dans l'apprentissage et la ARM, ce qui est contradictoire avec les résultats indiquant que les DPM sécrèteraient de la sérotonine nécessaire pour la formation de la ARM (Lee et al., 2011). Néanmoins il est aussi possible que les défauts de développement des neurones DPM soient qualitativement ou quantitativement de nature à empêcher la formation de la MTM et de la LTM, mais pas celle de la ARM.

2) Rôle d'AMN dans les MB pour la mémoire chez l'adulte

Si nous pensons que l'expression d'amn dans les neurones DPM adultes n'est pas requise pour la mémoire, nous avons en revanche démontré que son expression est requise pour la MTM et la LTM chez l'adulte dans les neurones α/β des MB (Figure 48). L'AMN sécrété par les neurones α/β semble jouer un rôle autocrine en activant le lobe α pour maintenir l'activation de l'Adénylate Cyclase (AC) rutabaga responsable de la détection de coïncidence permettant la formation de la MTM.

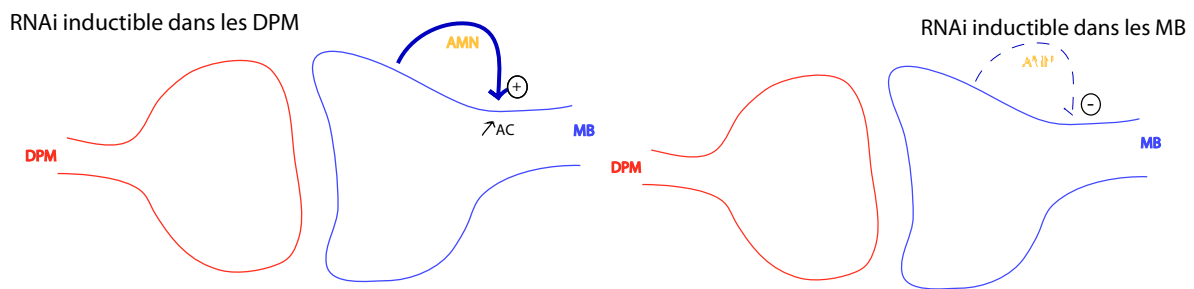


Figure 48 : Schéma récapitulatif des phénotypes observés lors de l'expression d'un RNAi inducible dans les neurones DPM ou dans les MB.

L'expression d'un RNAi-amn dans les neurones DPM adultes ne provoque pas de phénotype de mémoire. Par conséquent, soit les neurones DPM adultes n'expriment pas amnesiac, soit cette expression n'est pas requise pour la mémoire. L'expression d'un RNAi-amn dans les MB adultes empêche l'activation de l'AC requise pour lors de la détection de coïncidence.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats contredisent ceux publiés par S. Waddell (Waddell et al., 2000). D'une part l'expression d'amn est requise dans les neurones DPM à minima pour le développement de ces neurones, et d'autre part, l'expression d'amn dans les MB est requise pour la mémoire. Nous avons ainsi cherché à analyser l'expression d'amn dans les MB par plusieurs approches :

1) Des expériences d'hybridation in situ réalisées par Noé Testa au laboratoire n'ont pas été concluantes.

2) Par des approches d'anticorps spécifiques. A ce jour un seul anticorps dirigé contre amn a été publié (Waddell et al., 2000). Malgré nos demandes, nous n'avons pas reçu cet anticorps. De plus, ayant été produit il y a 17 ans, il est possible que cet anticorps ne soit plus fonctionnel. Nous avons donc tenté de faire produire des anticorps dirigés contre les deuxième et troisième neuropeptides contenus dans amnesiac (Pineda-Anticorps-Service, Berlin). Malheureusement, ces anticorps polyclonaux de lapin n'ont pas permis de mettre en évidence la protéine AMN ni en Western Blot, ni par des expériences de marquage de cerveaux in toto.

3) Noé Testa a utilisé la technique de CRISPR-Cas9 pour introduire une séquence codant 3 tag HA à l'extrémité C-terminale du prépropeptide amnesiac. Les expériences de marquage de cerveaux in toto avec un anticorps anti-HA sont en cours. Les résultats préliminaires indiquent un marquage plus fort au niveau des calices chez les cerveaux de la lignée HA.

4) Enfin, nous avons quantifié les RNA-amn dans des têtes de drosophile exprimant l'un ou l'autre des RNAi spécifiques d'amn sous le contrôle de deux drivers des MB. Nos résultats montrent que l'expression des RNAi dans les MB provoque une diminution de l'expression d'amnesiac.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats démontre qu'amn est exprimé dans les MB, et que cette expression est requise pour la mémoire.

Nos expériences de sauvetage montrent que les défauts de MTM et de LTM d'un mutant nul amn sont sauvés par l'expression constitutive d'amnesiac aussi bien dans les MB que dans les neurones DPM (Figure 49A et B). Par conséquent, on peut supposer que la surexpression d'amnesiac dans les neurones DPM permet non seulement de restaurer un développement normal de ces neurones, mais aussi de restaurer l'activation de l'AC dans les MB chez l'adulte. Réciproquement, la surexpression du gène amn dans les MB d'un mutant nul permet de restaurer une activité normale de l'AC pour la détection de coïncidence, et également le développement normal des neurones DPM. Nous concluons que le fait qu'amnesiac soit sécrété lui permet, lorsqu'il est surexprimé, d'agir sur les deux structures : sa surproduction dans une structure peut pallier à l'absence de sa synthèse dans une autre structure, et ainsi remplir son rôle dans cette structure.

L'expression d'amnesiac uniquement dans les MB adultes ne permet pas de sauver le défaut de mémoire du mutant amn^{x8}. Ce résultat était attendu du fait que l'expression chez l'adulte ne peut sauver le défaut de développement des neurones DPM (Figure 49C). En revanche, les femelles hétérozygotes amn^{x8}/+ qui n'ont, a priori, pas de défaut de développement des neurones DPM, présentent des défauts de MTM et de LTM qui peuvent être sauvés par l'expression d'amnesiac dans les MB chez l'adulte (Figure 49D), indiquant ainsi que le développement normal des neurones DPM aurait aussi un rôle dans la maintenance de l'activité des MB nécessaire pour la formation de la MTM.

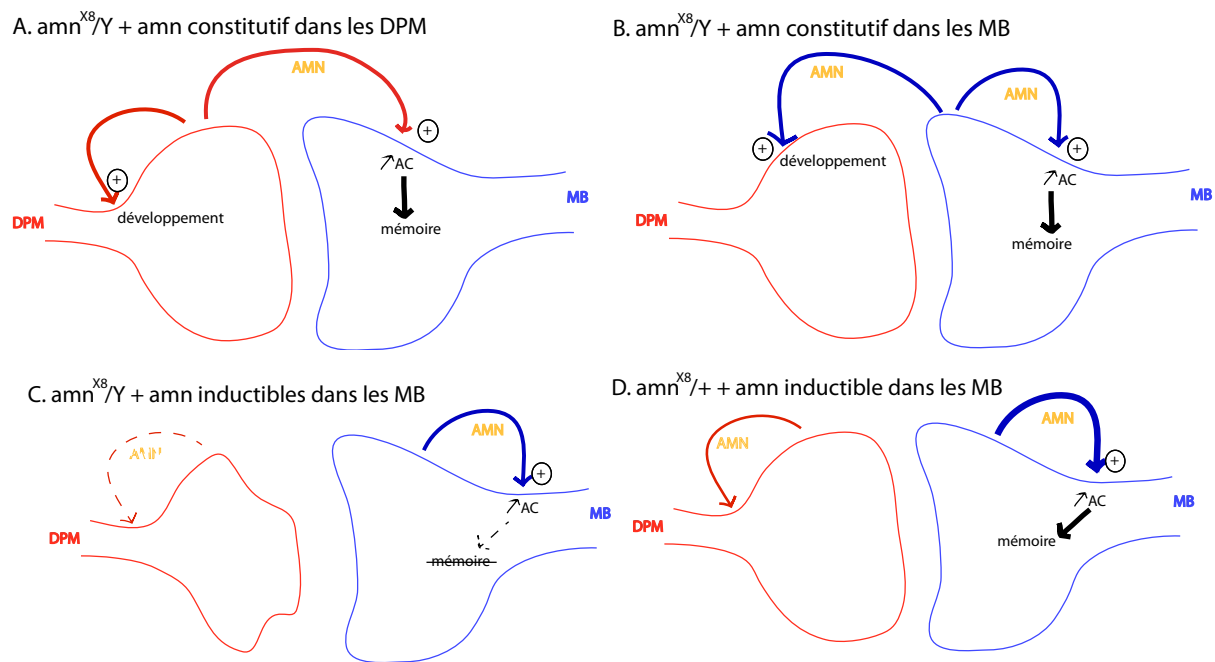


Figure 49 : Schéma récapitulatif des phénotypes de sauvetage du mutant amn^{X8} observés.

A-B. L'expression constitutive d'amnesiac, soit dans les neurones DPM soit dans les MB, dans un mutant nul, permet de sauver à la fois le défaut de développement des neurones DPM et la détection de coïncidence dans les MB adultes. **C.** L'expression d'amnesiac dans les MB adultes dans un mutant nul ne permet pas de sauver le défaut de MTM causé par un défaut de développement des neurones DPM. Il serait important de vérifier si la détection de coïncidence est, elle, sauvée dans les MB adultes **D.** L'expression d'amnesiac dans les MB adultes dans un mutant $amn^{X8}/+$, ayant un développement normal des neurones DPM, permet de sauver la détection de coïncidence et le défaut de MTM.

En conclusion notre étude a permis de révéler un double rôle d'amnesiac pour la mémoire : dans les MB adultes pour la détection de coïncidence, et dans le développement des neurones DPM qui sont également requis pour la mémoire, ce qui rend l'étude de ce gène extrêmement complexe.

3) Pour l'instant aucun récepteur n'a été identifié pour amnesiac

Le récepteur d'amnesiac n'a pas été identifié chez la drosophile. Il est possible qu'il y ait en réalité plusieurs récepteurs puis qu'amnesiac est composé de 3 peptides putatifs. On ignore encore lequel, ou lesquels, est impliqué dans la mémoire mais le neuropeptide homologue de PACAP est le candidat le plus probable, vu nos résultats concernant la détection de coïncidence et l'implication de PACAP dans l'activation de l'AC chez les mammifères. En se basant sur les observations faites chez les mammifères, plusieurs

récepteurs putatifs pourraient être attribués à amn. En effet, PACAP, GHRH et VIP, descendant du même gène ancestral par des événements de duplication, se fixent sur des récepteurs communs ayant des affinités différentes pour chaque peptide. PACAP se lie principalement au récepteur PAC₁, ainsi qu'à VPAC₁ et VPAC₂ qui ont une affinité plus forte pour VIP que pour PACAP. La GHRH peut aussi se lier à VPAC₁ et VPAC₂, avec une affinité plus faible que PACAP, et possède aussi son propre récepteur, GHRH-R. Chez la drosophile, plusieurs gènes possédant des similitudes avec ces récepteurs ont été identifiés : PDF-R, hector (Li et al., 2011), Dh44R₁ et R₂ et Dh31-R. Tous ces gènes codent des GPCR qui permettent d'activer la PKA, la PLC ou les MAPK. Le ligand pour hector est encore inconnu, Dh44-R₁, -R₂ et Dh31-R sont des récepteurs d'hormones diurétiques, Dh44 et Dh31 respectivement (Cabrero et al., 2002; Johnson et al., 2005), et PDF-R est le principal récepteur du PDF, qui possède de nombreuses similitudes fonctionnelles avec le peptide VIP (Mertens et al., 2005).

III. Un possible circuit pour la MTM et la LTM entre les neurones DPM et les MB impliquant les néprilysines, APPL et AMN

1) Nouvelle hypothèse concernant les interactions entre les neurones DPM et les MB

La principale hypothèse retenue pour la formation de la MTM et de la LTM est l'existence d'une boucle de régulation positive entre les neurones DPM et les MB : les MB seraient activés lors de l'arrivée conjointe des signaux de l'odeur et des chocs électriques, et activeraient à leur tour les neurones DPM qui sécrèteraient AMN pour maintenir l'excitation des MB nécessaire à la formation de la mémoire. Néanmoins plusieurs observations vont à l'encontre de cette hypothèse. En 1^{er} lieu, Haynes et collègues (2015) ont montré que les neurones DPM sont inhibiteurs, et non pas excitateurs comme il avait toujours été supposé, et sécrètent du GABA et de la sérotonine (5HT) sur les lobes des MB. La 5HT se lierait à des récepteurs 5HT_{1A}-R inhibiteurs et permettrait la formation de la ARM (Lee et al., 2011) alors que le GABA diminuerait l'activité des MB. En 2nd lieu, nous avons pu montrer que AMN est requis pour la mémoire chez les drosophiles adultes dans les MB et non pas dans les neurones

DPM. Enfin, il a été montré que les jonctions gap existant entre les neurones DPM et APL (Antero Paired Lateral) une paire de neurones GABAergiques et octopaminergiques innervant largement les lobes des MB, permettraient la formation de la MTM (Wu et al., 2011). En revanche, l'activation des APL permet la formation de la MT-ARM via la sécrétion d'octopamine (Wu et al., 2013), laissant penser que les jonctions gap permettraient de diminuer l'action des neurones DPM et APL pour permettre la formation de la mémoire labile.

A partir de ces observations, l'hypothèse d'une boucle de régulation positive entre DPM et MB semble peu probable. Il est en revanche possible qu'il s'agisse d'une boucle de régulation négative pour limiter l'excitotoxicité au niveau des MB résultant de la maintenance de l'activité électrique nécessaire à la formation et la consolidation de la mémoire labile.

2) Rôles possibles d'APPL comme liaison entre les neurones DPM et les MB

Nous avons pu montrer que l'expression d'un RNAi-*Appl* dans les neurones DPM adultes provoque un défaut de MTM et de LTM, tout en laissant l'apprentissage intact. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans les MB (Goguel et al., 2011; Bourdet et al., 2015b) et indiquent que APPL est requis pour la formation des mêmes phases de mémoires dans différentes structures.

Il est possible que l'APPL présent dans les deux structures puisse avoir des rôles différents et être impliqué dans des mécanismes distincts permettant de former ces mêmes mémoires. Néanmoins, il est aussi possible que les protéines APPL présentes à la membrane au niveau des synapses entre ces deux structures soient impliquées dans une même fonction. Elles pourraient soit avoir un rôle de récepteur (APPL membranaire) – ligand (métabolite d'APPL sécrété par exemple) pour permettre la communication entre les deux structures, soit interagir pour former des transdimères permettant de rapprocher les membranes et promouvoir la synaptogénèse et la plasticité synaptique, comme chez les mammifères (Baumkotter et al., 2014; Stahl et al., 2014).

Au cours du vieillissement, il a pu être montré que les contacts synaptiques entre les neurones DPM et les MB diminuent, ce qui empêche la formation de la trace mnésique de la LTM et la formation de cette forme de mémoire (Tonoki and Davis, 2012), Figure 50). Des transdimères d'APPL pourraient être responsables de ces interactions entre les

neurones DPM et les MB. Il a été montré que le défaut de LTM dû à la déficience d'*Appl* ne peut être sauvé que par l'expression d'APPL dans les MB (Bourdet et al., 2015b). Ce résultat pourrait s'expliquer par la diminution des contacts synaptiques, non pas dus au vieillissement mais à la diminution d'APPL membranaire, alors que l'expression d'APPL dans les MB permettrait de restaurer un nombre suffisant de transdimères d'APPL pour permettre une formation normale de la LTM.

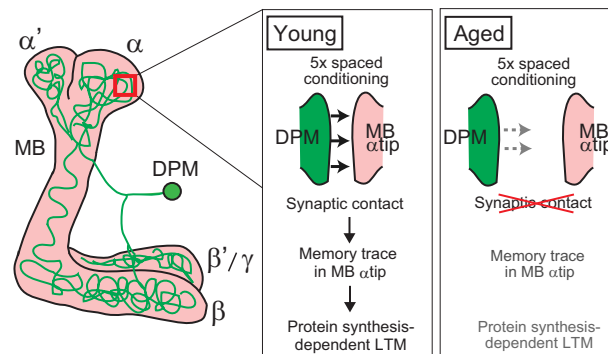


Figure 50 : Modèle de l'effet de l'âge sur les circuits neuronaux et la formation de la LTM (Tonoki and Davis, 2012).

Les neurones DPM ramifient leurs neurites (en vert) sur tous les lobes des MB. Chez les drosophiles jeunes la formation de la LTM requiert une transmission synaptique avec les neurones DPM pendant les 5 cycles espacés et des contacts synaptiques des neurones DPM avec les axones des neurones α/β , surtout au niveau de la pointe du lobe α . Chez les drosophiles âgées, les contacts synaptiques entre neurones DPM et les MB sont perdus, conduisant à une perte de la LTM et de la trace mnésique correspondante.

3) Interactions potentielles entre les protéines néprilysines, APPL et AMN

D'après les travaux réalisés lors de cette thèse, nous avons démontré que les néprilysines, l'interaction entre Nep1 et les peptides $dA\beta$, ainsi la protéine amnesiac, sont toutes spécifiquement impliquées dans la formation de la MTM et de la LTM (Tableau 5). De plus, Nep1, APPL et amnesiac sont requis dans les MB et dans les neurones DPM, alors que l'interaction entre Nep1 et les peptides amyloïdes n'a pu être mise en évidence que dans les neurones DPM. Les fonctions révélées pour chacune de ces études sont spécifiques de l'adulte, sauf en ce qui concerne amnesiac dont nous avons montré le rôle dans le développement des neurones DPM. Etant donné que ces gènes sont requis dans les mêmes structures pour la formation des mêmes phases de mémoire, il est possible de penser qu'ils puissent interagir entre eux au sein des mêmes

voies moléculaires. Au cours de ma thèse, nous avons ainsi pu montrer que Nep1 interagit avec APPL (via la dégradation des peptides dA β) dans les neurones DPM.

	MB	DPM
MTM	Nep1 Appl amn	Nep1 Appl (Nep1-dA β)
LTM	Nep1 Appl amn	Nep1 Appl (Nep1-dA β)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des protéines requises pour la formation de la MTM et de la LTM dans les MB et les neurones DPM adultes.

Chez les mammifères, de nombreuses interactions ont été démontrées entre les gènes NEP, PACAP et APP : NEP peut cliver PACAP₃₈ pour générer PACAP₂₇, une forme active spécifique du récepteur VIP₁ (Gourlet et al., 1997), alors que PACAP₃₈ permet d'augmenter l'expression de NEP via son action sur la somatostatine (Rat et al., 2011). Il a aussi été montré que l'AICD issu du clivage d'APP par la voie amyloïde pouvait se fixer à Fe65/Tip60 pour activer la transcription de différents gènes dont NEP (Pardossi-Piquard and Checler, 2011; Grimm et al., 2015). Ces interactions laissent à penser que ces 3 gènes pourraient agir dans de mêmes voies, pour former des boucles de régulation successives.

De plus, APPL, les néprilysines et AMN pourraient agir sur le développement et l'élongation des neurites pour permettre une formation correcte du circuit permettant la cognition et la mémoire.

IV. Conclusion générale : un nouveau modèle ?

Les expériences décrites lors de cette thèse ont mis en évidence des voies permettant la formation de formes de mémoires spécifiques dans deux types de neurones : les MB et les DPM. Il n'est pas encore possible, à partir des expériences faites, de déterminer si ces

voies sont parallèles ou s'il s'agit de la même voie avec des interactions au sein d'un circuit neuronal.

Les MB sécrèteraient AMN pour permettre de maintenir l'activation des MB nécessaire pour la formation de la mémoire MTM et, dans un 2nd temps, ils pourraient activer les neurones DPM, via AMN ou un autre signal, afin d'enclencher une boucle de régulation négative entre les neurones DPM et les MB. APPL d'une part renforcerait les connexions entre les neurones DPM et les MB, par exemple par des interactions de type transdimères, et d'autre part activerait des voies de signalisation favorisant la formation des mémoires labiles. Enfin les néprilysines permettraient de limiter l'hyperactivation des voies de signalisation en dégradant les neuropeptides responsables de la formation de la mémoire, comme les peptides dA β ou amnesiac par exemple (Figure 51).

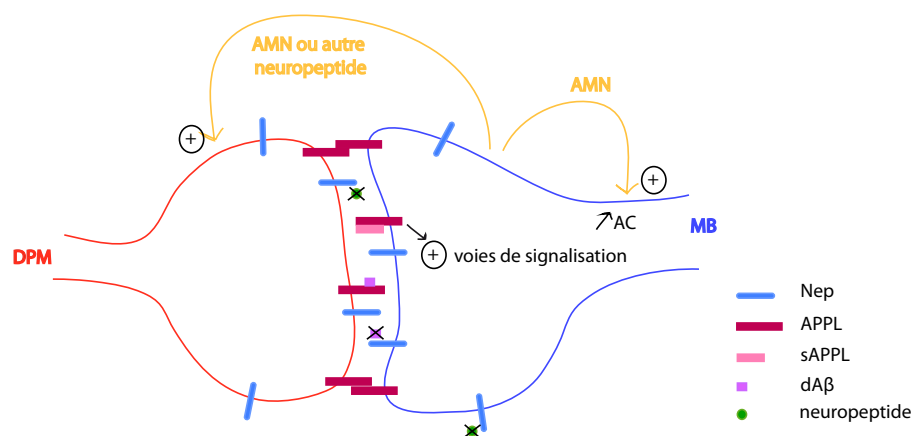


Figure 51 : Schéma des interactions possibles concernant les gènes étudiés lors de cette thèse à la synapse DPM/MB chez la drosophile adulte.

Les MB sécrètent AMN pour activer l'AC dans les MB et AMN, ou un autre neuropeptide, pour activer les neurones DPM pour initier une boucle de régulation afin de limiter l'activité des MB. Les protéines APPL présentes sur les deux membranes, peuvent soit former des transdimères pour favoriser la plasticité synaptique, soit agir comme récepteurs pour différents ligands, comme sAPPL et dA β , pour activer des voies de signalisation. Les néprilysines présentes aux deux membranes clivent des neuropeptides, dont les peptides dA β et potentiellement amnesiac, pour limiter leur action.

Bibliographie

- Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.
- Akalal DBG, Yu D, Davis RL (2010) A Late-Phase, Long-Term Memory Trace Forms in the γ Neurons of *Drosophila* Mushroom Bodies after Olfactory Classical Conditioning. *J Neurosci* 30:16699–16708.
- Aldrich BT, Kasuya J, Faron M, Ishimoto H, Kitamoto T (2010) The amnesiac gene is involved in the regulation of thermal nociception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 24:33–41.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla MA, Sambamurti K (2015) Amyloid- β protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 12:32–46.
- Barnes K, Turner AJ, Kenny AJ (1992) Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. *J Neurochem* 58:2088–2096.
- Barnstedt O, Oswald D, Felsenberg J, Brain R, Moszynski J-P, Talbot CB, Perrat PN, Waddell S (2016) Memory-Relevant Mushroom Body Output Synapses Are Cholinergic. *Neuron* 89:1237–1247.
- Baumkotter F, Schmidt N, Vargas C, Schilling S, Weber R, Wagner K, Fiedler S, Klug W, Radzimanowski J, Nickolaus S, Keller S, Eggert S, Wild K, Kins S (2014) Amyloid Precursor Protein Dimerization and Synaptogenic Function Depend on Copper Binding to the Growth Factor-Like Domain. *J Neurosci* 34:11159–11172.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23:213–227.
- Ben Khalifa N, Tyteca D, Marinangeli C, Depuydt M, Collet JF, Courtoy PJ, Renauld JC, Constantinescu S, Octave JN, Kienlen-Campard P (2012) Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *The FASEB Journal* 26:855–867.
- Bernards A, Hariharan IK (2001) Of flies and men—studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11:274–278.
- Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, Saki N (2015) Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*:1–11.
- Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Bland ND, Robinson P, Thomas JE, Shirras AD, Turner AJ, Isaac RE (2009) Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2. *Peptides* 30:571–574.

- Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *NeuroReport* 8:1025–1029.
- Bourdet I, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2015a) Amyloid- β Peptide Exacerbates the Memory Deficit Caused by Amyloid Precursor Protein Loss-of-Function in *Drosophila*. *PLoS ONE* 10:e0135741–14.
- Bourdet I, Preat T, Goguel V (2015b) The Full-Length Form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein Is Involved in Memory Formation. *J Neurosci* 35:1043–1051.
- 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.
- 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.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 82:239–259.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.
- Burnouf S, Gorsky MK, Dols J, Grönke S, Partridge L (2015) A β 43 is neurotoxic and primes aggregation of A β 40 in vivo. *Acta Neuropathologica* 130:35–47.
- Busto GU, Cervantes-Sandoval I, Davis RL (2010) Olfactory Learning in *Drosophila*. *Physiology* 25:338–346.
- Cabrero P, Radford JC, Broderick KE, Costes L, Veenstra JA, Spana EP, Davies SA, Dow JAT (2002) The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *J Exp Biol* 205:3799–3807.
- Cao W, Song HJ, Gangi T, Kelkar A, Antani I, Garza D, Konsolaki M (2008) Identification of Novel Genes That Modify Phenotypes Induced by Alzheimer's β -Amyloid Overexpression in *Drosophila*. *Genetics* 178:1457–1471.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tschäpe J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Caron SJC, Ruta V, Abbott LF, Axel R (2013) Random convergence of olfactory inputs in the *Drosophila* mushroom body. *Nature* 497:113–117.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.
- Colombo S, Broggi S, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Martegani E (2017) Detection of cAMP and of PKA activity in *Saccharomyces cerevisiae* single cells using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) probes. *Biochem Biophys Res Commun* 487:594–599.
- Comas D, Petit F, Preat T (2004) *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* 430:460–463.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of

- Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Dauwalder B, Davis RL (1995) Conditional rescue of the dunce learning/memory and female fertility defects with *Drosophila* or rat transgenes. *J Neurosci* 15:3490–3499.
- Davis RL (2011) Traces of *Drosophila* memory. *Neuron* 70:8–19.
- Davis RL, Cherry J, Dauwalder B, Han PL, Skoulakis E (1995) The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Mol Cell Biochem* 149-150:271–278.
- de Belle SJ, Heisenberg M (1994) Associative Odor Learning in *Drosophila* Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies. *Science* 263:692–695.
- DeZazzo J, Xia SZ, Christensen J, Velinzon K, Tully T (1999) Developmental expression of an amn(+) transgene rescues the mutant memory defect of amnesiac adults. *J Neurosci* 19:8740–8746.
- Didelot G, Molinari F, Tchénio P, Comas D, Milhiet E, Munnich A, Colleaux L, Preat T (2006) Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313:851–853.
- Dubnau J, Chiang A-S (2013) Systems memory consolidation in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* 23:84–91.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1684–1688.
- Dudai Y, Uzzan A, Zvi S (1983) Abnormal activity of adenylate cyclase in the *Drosophila* memory mutant rutabaga. *Neuroscience Letters* 42:207–212.
- Dura J-M, Preat T, Tully T (1993) Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 21:307–320.
- Elliott DA, Brand AH (1999) The GAL4 System. *Nature* 400:457–461.
- Farca Luna AJ, Perier M, Seugnet L (2017) Amyloid Precursor Protein in *Drosophila* Glia Regulates Sleep and Genes Involved in Glutamate Recycling. *J Neurosci* 37:4289–4300.
- Fiala A, Spall T (2003) In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic cameleon expression. *Sci STKE* 2003:PL6–p16.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's A β ₄₂-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Freeman MR (2015) *Drosophila* Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020552–15.
- Freeman MR, Doherty J (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci* 29:82–90.
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with A β pathology. *Neurosci Res* 43:39–56.
- Gao Q, Yuan B, Chess A (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3:780–785.

- Garcia-Osta A, Alberini CM (2009) Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem* 16:267–272.
- George S, Petit GH, Gouras GK, Brundin P, Olsson R (2013) Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators and Selective Estrogen Receptor β Agonists Moderate Cognitive Deficits and Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci* 4:1537–1548.
- 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.
- Goedhart J, Gadella TWJ (2009) Fluorescence resonance energy transfer imaging of PKC signalling in living cells using genetically encoded fluorescent probes. *Journal of The Royal Society Interface* 6:S27–S34.
- Goguel V, Belair AL, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Gouras GK, Olsson TT, Hansson O (2014) β -amyloid Peptides and Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 12:3–11.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR (2010) Intraneuronal A β 42 Accumulation in Human Brain. *AJPA* 156:15–20.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P, Deschodt-Lanckman M (1997) Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) Degradation by the Neutral Endopeptidase EC 3.4.24.11. *Biochem Pharmacol* 54:509–515.
- Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Haupenthal VJ, Blümel T, Hundsdoerfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77.
- Gunawardena S, Goldstein LS (2001) Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32:389–401.
- Hallier B, Schiemann R, Cordes E, Vitos-Faleato J, Walter S, Heinisch JJ, Malmendal A, Paululat A, Meyer H (2016) *Drosophila* neprilysins control insulin signaling and food intake via cleavage of regulatory peptides. *eLife* 5:250.
- Han Z, Jin L, Platasa J, Cohen LB, Baker BJ, Pieribone VA (2013) Fluorescent Protein Voltage Probes Derived from ArcLight that Respond to Membrane Voltage Changes with Fast Kinetics. *PLoS ONE* 8:e81295–e81299.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Harvey CD, Ehrhardt AG, Cellurale C, Zhong H, Yasuda R, Davis RJ, Svoboda K (2008) A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19264–19269.
- Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2002) Higher brain functions of PACAP and a homologous

- Drosophila memory gene amnesiac: insights from knockouts and mutants. *Biochem Biophys Res Commun* 297:427–432.
- Haynes PR, Christmann BL, Griffith LC (2015) A single pair of neurons links sleep to memory consolidation in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 4:e03868.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüdiger T, Kretschmar von H, Koch von C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO Journal* 23:4106–4115.
- Hong CS, Koo EH (1997) Isolation and characterization of *Drosophila* presenilin homolog. *NeuroReport* 8:665–668.
- Hüttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirths O (2015) Neprilysin deficiency alters the neuropathological and behavioral phenotype in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 44:1291–1302.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) A β 42 Mutants with Different Aggregation Profiles Induce Distinct Pathologies in *Drosophila*. Lashuel H, ed. *PLoS ONE* 3:e1703–e1708.
- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6623–6628.
- Imai T, Sakano H, Vosshall LB (2010) Topographic mapping--the olfactory system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001776.
- Isabel G, Pascual A, Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304:1024–1027.
- Isabel G, Preat T (2008) Molecular and system analysis of olfactory memory in *Drosophila*. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*.
- Isbert S, Wagner K, Eggert S, Schweitzer A, Multhaup G, Weggen S, Kins S, Pietrzik CU (2011) APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. *Cell Mol Life Sci* 69:1353–1375.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem* 5:52–77.
- Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S-I, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Saido TC (2004) Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid-beta Peptide in Mouse Brain. *J Neurosci* 24:991–998.
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70:493–500.
- Jacobsen KT, Iverfeldt K (2009) Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* 66:2299–2318.

- Jefferis GSXE, Potter CJ, Chan AM, Marin EC, Rohlffing T, Maurer CR, Luo L (2007) Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128:1187–1203.
- Jin L, Han Z, Platasa J, Woollorton JRA, Cohen LB, Pieribone VA (2012) Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* 75:779–785.
- Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH (2005) A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J Exp Biol* 208:1239–1246.
- Kakiya N, Saito T, Nilsson P, Matsuba Y, Tsubuki S, Takei N, Nawa H, Saido TC (2012) Cell Surface Expression of the Major Amyloid- β Peptide (A β)-degrading Enzyme, Neprilysin, Depends on Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase (MEK) and Dephosphorylation by Protein Phosphatase 1a. *J Biol Chem* 287:29362–29372.
- Kandel E, Abel T (1995) Neuropeptides, Adenylyl-Cyclase, and Memory Storage. *Science* 268:825–826.
- Keene AC, Krashes MJ, Leung B, Bernard JA, Waddell S (2006) *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr Biol* 16:1524–1530.
- Keene AC, Stratmann M, Keller A, Perrat PN, Vosshall LB, Waddell S (2004) Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* 44:521–533.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Schally AV (2011) Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22:311–317.
- Knapik S, Sigrist S, Tanimoto H (2011) Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *J Neurosci* 31:3453–3458.
- Lasher RS, Lutz EM, Mulholland F, Sanderson R, Stewart JM, Bublitz C (1990) Immunocytochemical localization of endopeptidase-24.11 in the nucleus tractus solitarius of the rat brain. *Neuroscience Letters* 117:43–49.
- 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 USA* 108:13794–13799.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-Linking of Cell Surface Amyloid Precursor Protein Leads to Increased β -Amyloid Peptide Production in Hippocampal Neurons: Implications for Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Leulier F, Lemaitre B (2008) Toll-like receptors — taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 9:165–178.
- Leuschner PJF, Obernosterer G, Martinez J (2005) MicroRNAs: Loquacious Speaks out. *Curr Biol* 15:R603–R605.
- Li Y, Hoxha V, Lama C, Dinh BH, Vo CN, Dauwalder B (2011) The hector G-Protein Coupled Receptor Is Required in a Subset of fruitless Neurons for Male Courtship Behavior. *PLoS ONE* 6:e28269–10.

- 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.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufienbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human Amyloid Precursor Protein Ameliorates Behavioral Deficit of Flies Deleted for *Appl* Gene. *Neuron* 9:595–605.
- Ma J, Ptashne M (1987) The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50:137–142.
- Marin EC, Jefferis GSXE, Komiyama T, Zhu H, Luo L (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109:243–255.
- Martin-Morris LE, White K (1990) The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* 110:185–195.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765–1768.
- Meilandt WJ, Cisse M, Ho K, Wu T, Esposito LA, Searce-Levie K, Cheng IH, Yu GQ, Mucke L (2009) Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J Neurosci* 29:1977–1986.
- Merdes G, Soba P, Loewer A, Bilic MV, Beyreuther K, Paro R (2004) Interference of human and *Drosophila* APP and APP-like proteins with PNS development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* 23:4082–4095.
- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH (2005) PDF Receptor Signaling in *Drosophila* Contributes to Both Circadian and Geotactic Behaviors. *Neuron* 48:213–219.
- Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A (2009) Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Mol Cancer* 8:128–12.
- Moretti C, Mencacci C, Frajese GV, Cerilli M, Frajese G (2002) Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13:428–435.
- Murthy M, Fiete I, Laurent G (2008) Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 59:1009–1023.
- Müller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—

- Relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393–406.
- Müller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006288.
- Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ (2012a) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 120 Suppl 1:167–185.
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012b) The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Neprilysin: Can We Control It? *Int J Alzheimers Dis* 2012.
- Nalivaeva NN, Turner AJ (2013) The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters* 587:2046–2054.
- Neve RL, McPhie DL, Chen YH (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Nichols CD (2006) *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics* 112:677–700.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204.
- Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I (1995) Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem* 270:4205–4208.
- Panz M, Vitos-Faleato J, Jendretzki A, Heinisch JJ, Paululat A, Meyer H (2012) A novel role for the noncatalytic intracellular domain of Neprilysins in muscle physiology. *Biol Cell* 104:553–568.
- Pardossi-Piquard R, Checler F (2011) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120:109–124.
- Pascual A, Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ (2004) A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117:83–94.
- Pitman JL, Huetteroth W, Burke CJ, Krashes MJ, 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.
- Plaçaïs P-Y, de Treder É, Scheunemann L, Trannoy S, Goguel V, Han K-A, Isabel G, Preat T (2017) Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nat Comms* 8:15510.
- Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, Mohajeri MH (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A β -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis* 24:475–483.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A (2015) The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience* 307:26–36.

- Puzzo D, Privitera L, Fa M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O (2011) Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819–830.
- Qiu Y, Davis RL (1993) Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes & development* 7:1447–1458.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:708–712.
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature* 277:212–214.
- Ramdya P, Benton R (2010) Evolving olfactory systems on the fly. *Trends Genet* 26:307–316.
- Rat D, Schmitt U, Tippmann F, Dewachter I, Theunis C, Wiczczak E, Postina R, van Leuven F, Fahrenholz F, Kojro E (2011) Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *The FASEB Journal* 25:3208–3218.
- Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, Reale M (2017) Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation. *Curr Alzheimer Res* 14:1–1.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 11:1114–1125.
- Robinson SR, Bishop GM (2002) A β as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:1051–1072.
- Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolaños JP (2013) Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: Role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochemistry International* 62:750–756.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a Conserved Metalloprotease-Disintegrin Protein with Two Roles in *Drosophila* Neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo L, White K (1989) A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2478–2482.
- Saito S, Ihara M (2014) New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci* 6.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434–439.
- Sample V, Mehta S, Zhang J (2014) Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of cell science* 127:1151–1160.
- San Martín A, Ceballo S, Baeza-Lehnert F, Lerchundi R, Valdebenito R, Contreras-Baeza Y, Alegría K, Barros LF (2014) Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PLoS ONE* 9:e85780.
- Sarantseva S, Timoshenko S, Bolshakova O, Karaseva E, Rodin D, Schwarzman AL, Vitek MP

- (2009) Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 4:e8191.
- Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M (2012) BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 414:171–178.
- Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Séjourné J, Plaçais P-Y, Aso Y, Siwanowicz I, Trannoy S, Thoma V, Tedjakumala SR, Rubin GM, 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.
- Sitnik JL, Francis C, Hens K, Huybrechts R, Wolfner MF, Callaerts P (2014) Neprilysins: An Evolutionarily Conserved Family of Metalloproteases That Play Important Roles in Reproduction in *Drosophila*. *Genetics* 196:781–797.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL (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.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The *Drosophila* Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562–13.
- Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, Patrick C, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2008) Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:109–112.
- Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170–175.
- Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218:341–347.
- Stahl R, Schilling S, Soba P, Rupp C, Hartmann T, Wagner K, Merdes G, Eggert S, Kins S (2014) Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front Cell Neurosci* 8:410.
- Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Stozická Z, Zilka N, Novák M (2007) Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol* 51:205–222.
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13:1852–1861.
- Sutcliffe B, Forero MG, Zhu B, Robinson IM, Hidalgo A (2013) Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *PLoS ONE* 8:e75902–e75915.

- Tampellini D, Rahman N, Lin MT, Capetillo-Zarate E, Gouras GK (2011) Impaired β -Amyloid Secretion in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Neurosci* 31:15384–15390.
- Tamura T, Chiang A-S, Ito N, Liu H-P, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M (2003) Aging specifically impairs amnesiac-dependent memory in *Drosophila*. *Neuron* 40:1003–1011.
- Tanaka NK, Tanimoto H, Ito K (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* 508:711–755.
- Tanzi RE, Bertram L (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181–184.
- Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, Bland ND (2005) *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function. *Biochem J* 386:357–366.
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods* 6:875–U113.
- Tonoki A, Davis RL (2012) Aging impairs intermediate-term behavioral memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6319–6324.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K (1999a) Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9:489–493.
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the *Drosophila* Member of the APP-Family, Exhibits Differential Trafficking and Processing in CNS Neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999b) The *Drosophila* β -amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.
- Tudorache IF, Trusca VG, Gafencu AV (2017) Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. *Comput Struct Biotechnol J* 15:359–365.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic Dissection of Consolidated Memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical-Conditioning and Retention in Normal and Mutant *Drosophila-Melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157:263–277.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D (2001) The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 23:261–269.
- Turrel O, Lampin-Saint-Amaux A, Preat T, Goguel V (2016) *Drosophila* Neprilysins Are Involved in Middle-Term and Long-Term Memory. *J Neurosci* 36:9535–9546.
- van der Voet M, Nijhof B, Oortveld MAW, Schenck A (2014) *Drosophila* models of early onset cognitive disorders and their clinical applications. *Neurosci Biobehav Rev* 46:326–342.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 102:147–159.
- Wachowiak M, Knöpfel T (2009) Optical Imaging of Brain Activity In Vivo Using Genetically

- Encoded Probes. In: *In Vivo Imaging of Brain Function*, 2nd ed. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Waddell S, Armstrong JD, Kitamoto T, Kaiser K, Quinn WG (2000) The amnesiac gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell* 103:805–813.
- Waddell S, Quinn WG (2001) What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet* 17:719–726.
- Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S (2007) Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 28:1713–1719.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wu C-L, Shih M-FM, Lai JS-Y, Yang H-T, Turner GC, 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.
- Wu C-L, Shih M-FM, 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.
- Yamamoto S, Schulze KL, Bellen HJ (2014) Introduction to Notch Signaling. In: *Notch Signaling*, pp 1–14 *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York.
- Yamashima T (2013) Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain–cathepsin hypothesis'—A perspective review. *Prog Neurobiol* 105:1–23.
- Yamashima T (2016) Can “calpain-cathepsin hypothesis” explain Alzheimer neuronal death? *Ageing Research Reviews* 32:169–179.
- Yang C-H, Shih M-FM, Chang C-C, Chiang M-H, Shih H-W, Tsai Y-L, Chiang A-S, Fu T-F, Wu C-L (2016) Additive Expression of Consolidated Memory through *Drosophila* Mushroom Body Subsets. *PLoS Genet* 12:e1006061.
- Yang MY, Armstrong JD, Vilinsky I, Strausfeld NJ, Kaiser K (1995) Subdivision of the *Drosophila* Mushroom Bodies by Enhancer-Trap Expression Patterns. *Neuron* 15:45–54.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res* 919:115–121.
- Yin JC, Wallach JS, Wilder EL, Klingensmith J, Dang D, Perrimon N, Zhou H, Tully T, Quinn WG (1995) A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Mol Cell Biol* 15:5123–5130.
- Yu D, Akalal D-BG, 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.
- Yu D, Keene AC, Srivatsan A, Waddell S, Davis RL (2005) *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* 123:945–957.
- Yu D, Ponomarev A, Davis RL (2004) Altered Representation of the Spatial Code for Odors after

Olfactory Classical Conditioning: Memory Trace Formation by Synaptic Recruitment. *Neuron* 42:437–449.

Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY (2005) Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437:569–573.

Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14997–15002.

Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegeneration* 1:5.

Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegeneration* 6.

Zhou L, Wei C, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang R, Wang D-S (2013) Distinct subcellular patterns of neprilysin protein and activity in the brains of Alzheimer's disease patients, transgenic mice and cultured human neuronal cells. *Am J Transl Res* 5:608–621.

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21:1369–1377.

Table des illustrations

Figure 1 : Le système Gal4/UAS chez la drosophile	13
Figure 2 : Le système Gal80ts/Gal4.....	14
Figure 3 : Modèle des voies Dicer-1 et Dicer-2 chez la drosophile.....	15
Figure 4 : Schéma de la sonde PKA AKAR.	17
Figure 5 : Schéma du cerveau de la drosophile.	18
Figure 6 : Les différents types de cellules gliales.	19
Figure 7 : Schéma simplifié de l'organisation anatomique du système olfactif.	20
Figure 8 : La drosophile comme modèle pour l'étude des maladies humaines.	22
Figure 9 : Conditionnement olfactif aversif associatif et formes de mémoires associées.	23
Figure 10 : Modèle des formes de mémoire parallèles.	24
Figure 11 : Représentation schématique des Mushroom Body et de leurs afférences olfactives	26
Figure 12 : Image de projection (à gauche) et schéma représentatif (à droite en rouge) du soma et des projections d'un neurone DPM sur les MB (dont le contours est indiqué en bleu)	27
Figure 13 : Modélisation 3D des neurones APL et DPM au sein du cerveau de drosophile...	28
Figure 14 : Schéma de la voie cAMP permettant la formation de la MTM et de la LTM dans les MB.....	30
Figure 15 : La détection de coïncidence lors de la formation de la mémoire olfactive aversive	31
Figure 16 : Structure du gène amnesiac.....	32
Figure 17 : Représentation d'un modèle des mécanismes du conditionnement olfactif chez la drosophile.....	33
Figure 18 : Schéma d'action de la PKA.....	35
Figure 19 : Illustration schématique de l'organisation des domaines de la famille d'APP.	42
Figure 20 : Les clivages séquentiels d'APP se produisent suivant 2 voies.	43
Figure 21 : Trafic et maturation d'APP dans les neurones.	45
Figure 22 : Schéma comparatif de la structure d' <i>Appl</i> de drosophile et d'APP humain.	49
Figure 23 : APPL comme modulateur de la voie de signalisation Wnt-PCP requise pour la guidance axonale.....	51

Figure 24 : Représentation schématique de la localisation et de l'activité de NEP dans le cerveau de mammifère.	54
Tableau 1 : Caractéristiques des 5 Néprilysines exprimées par la drosophile	56
Tableau 2 : Liste des transgènes et des mutants utilisés.	65
Figure 25 : Les barillets utilisés lors d'un conditionnement aversif.	67
Figure 26 : Schéma d'un cycle de conditionnement aversif.	67
Figure 27 : Dispositif de test utilisé.	68
Figure 28 : Représentation schématique de la préparation d'une drosophile pour l'imagerie in vivo.	71
Figure 29 : Représentation simplifiée de la sonde AKAR.	72
Figure 30 : Représentation simplifiée de la sonde GCaMP3.	73
Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les qPCR.	77
Figure 31 : Système d'induction Gal4-Sw.	95
Figure 32 : Nep2 est requise pour la LTM.	96
Figure 33 : Patron d'expression du pilote d'expression c316.	97
Figure 34 : L'expression d'un RNAi-Nep2 sous le contrôle du pilote d'expression c316 ne provoque pas de défaut de LTM.	97
Figure 35 : La mémoire affectée par l'expression de peptides dA β dans les neurones DPM de drosophiles présentant une réduction de Nep1 est de la MTM.	152
Figure 36 : La surexpression d'APPL dans les neurones DPM adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1.	153
Figure 37 : La surexpression de dBACE dans les neurones α/β adultes n'aggrave pas les défauts de MTM et de LTM causés par l'inhibition de Nep1.	155
Figure 38 : L'expression de peptides hA β ₄₂ dans les neurones DPM adultes sauve le défaut de MTM causé par l'expression d'un RNAi-Nep1.	156
Figure 39 : L'expression de peptides hA β ₄₂ dans les DPM adultes n'aggrave pas le défaut de LTM causé par l'inhibition de Nep1.	157
Figure 40 : L'expression de peptides dA β n'aggrave pas les défauts de MTM causés par l'expression d'un RNAi-Nep2 dans les neurones DPM adultes.	158
Figure 41 : L'inhibition ubiquitaire de Nep3 provoque une tendance à un défaut de MTM, de même que l'expression ubiquitaire de peptides dA β	159
Figure 42 : L'expression dans les neurones α/β adultes d'amnesiac ne permet pas de sauver le défaut de MTM des mâles amn ^{X8} /Y.	216

Figure 43 : L'expression d'amnesiac dans les neurones α/β adultes permet de sauver le défaut de MTM et de LTM des femelles $amn^{X8/+}$	217
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des phénotypes observés dans les MB et les neurones DPM lors des sauvetages des mutants $amn^{X8/Y}$ et $amn^{X8/+}$ par l'expression d' amn	218
Figure 44 : Schéma du rôle des Nep1-4 dans la MTM et la LTM à partir des résultats obtenus.	222
Figure 45 : Schéma illustrant l'hypothèse selon laquelle la Nep1 des MB ne pourrait interagir avec dA β à cause de sa localisation.	226
Figure 46 : Schéma récapitulatif du rôle d'amnesiac chez des drosophiles sauvages (WT) et des mutants hémizygotes ($amn^{X8/Y}$) ou hétérozygotes ($amn^{X8/+}$) pour amnesiac.	227
Figure 47 : Schéma récapitulatif des phénotypes observés lors de l'expression constitutive d'un RNAi- amn dans les neurones DPM.....	228
Figure 48 : Schéma récapitulatif des phénotypes observés lors de l'expression d'un RNAi inducible dans les neurones DPM ou dans les MB.....	230
Figure 49 : Schéma récapitulatif des phénotypes de sauvetage du mutant amn^{X8} observés..	232
Figure 50 : Modèle de l'effet de l'âge sur les circuits neuronaux et la formation de la LTM.	235
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des protéines requises pour la formation de la MTM et de la LTM dans les MB et les neurones DPM adultes.	236
Figure 51 : Schéma des interactions possibles concernant les gènes étudiés lors de cette thèse à la synapse DPM/MB chez la drosophile adulte.	237

Neuropeptides et Néprilysines : rôle dans la mémoire chez la Drosophile

Au cours de ma thèse j'ai étudié les néprilysines (Nep), des protéinases connues pour dégrader de petits neuropeptides, en particulier les peptides amyloïdes (A β). Lors de la maladie d'Alzheimer, les peptides A β s'agrègent pour former des plaques toxiques. Il a été montré que l'expression des Nep module l'effet toxique d'A β sur la mémoire chez les modèles murins. Néanmoins, le rôle des Nep dans la mémoire dans des conditions physiologiques reste à ce jour inconnu.

La drosophile exprime 4 Nep dans le système nerveux central adulte. Nous avons analysé leur rôle dans la mémoire olfactive. Les 4 Nep sont requises pour 2 phases spécifiques de mémoire: à moyen terme (MTM) et à long terme (LTM). De plus, nous avons identifié les neurones dans lesquels elles sont requises : les Mushroom Bodies (MB) ainsi qu'une paire de neurones afférents, les Dorsal Paired Medial neurons (DPM).

Nous avons ensuite cherché à savoir si A β était l'une des cibles des Nep. Nous avons montré que l'expression d'A β dans les DPM n'altère la MTM que lorsque l'expression de Nep1 est inhibée. De plus, le défaut de LTM de drosophiles exprimant A β dans les DPM est sauvé par la surexpression de Nep1. En conclusion, nos résultats suggèrent qu'A β est dégradé par Nep1 au cours des processus de mémorisation, et qu'A β est une cible de Nep1 en conditions non pathologiques.

Enfin, nous nous sommes intéressés au neuropeptide amnesiac, décrit comme étant requis pour la mémoire dans les DPM. Nos travaux démontrent qu'amnesiac est en fait requis dans les DPM pour leur développement, et chez l'adulte dans les MB pour activer l'adénylate cyclase responsable de la détection de coïncidence permettant la formation de la MTM.

Mots clés : *Drosophila melanogaster* ; mémoire olfactive ; neurones Dorsal Paired Medial ; Corps Pédonculés ; néprilysines ; amnesiac

Neuropeptides and Neprilysins: role in memory in *Drosophila*

During my PhD, I studied neprilysins, proteinases known to degrade small neuropeptides, in particular mammalian amyloid- β peptides (A β). During Alzheimer's disease, A β peptides aggregate to form toxic plaques. It has been shown that neprilysins expression modulates toxic effects of A β on memory in murine models of the disease. However, the role of neprilysins in memory under physiological conditions is still unknown.

Drosophila expresses 4 neprilysins in the adult central nervous system. First we have analyzed their role in olfactory memory. We have shown that all of them are required for 2 specific memory phases: Middle-Term Memory (MTM) and Long-Term Memory (LTM). We also have identified the neurons in which they are required: the Mushroom Bodies (MB) and a pair of afferent neurons, the Dorsal Paired Medial (DPM) neurons.

Then we investigated whether A β peptides could be one of the neprilysins' targets. We have shown that A β expression in DPM neurons alters MTM only when Nep1 expression is inhibited. Furthermore, the LTM deficit of flies expressing A β in DPM neurons is rescued by Nep1 overexpression. To conclude, our results suggest that Nep1 degrades endogenous A β peptides during memory processes, and that A β is a physiological target for Nep1 under non-pathological condition.

Finally, we became interested in the amnesiac neuropeptide, described as being required for memory in DPM neurons. Our work shows that amnesiac is actually required in DPM neurons for their development, and in the MB of adult flies in order to activate the adenylate cyclase responsible for coincidence detection leading to MTM formation.

Keywords : *Drosophila melanogaster*; olfactory memory; Dorsal Paired Medial neurons; Mushroom Bodies; neprilysins; amnesiac