



**HAL**  
open science

# Modulation de la prise de nourriture par des molécules amères chez *Drosophila melanogaster*

Perrine Colombi

► **To cite this version:**

Perrine Colombi. Modulation de la prise de nourriture par des molécules amères chez *Drosophila melanogaster*. Ecotoxicologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB063 . tel-03610856

**HAL Id: tel-03610856**

**<https://theses.hal.science/tel-03610856>**

Submitted on 16 Mar 2022

**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.

Modulation de la prise de nourriture par des  
molécules amères chez *Drosophila*  
*melanogaster*  
*Food intake modulation by bitter molecules in*  
*Drosophila melanogaster*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

Ecole doctorale n°581, Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement  
et Santé (ABIES)  
Spécialité de doctorat : Ecotoxicologie  
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR EGCE, 91190, Gif-sur-Yvette,  
France.  
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 01 décembre 2021, par**

**Perrine COLOMBI**

**Composition du Jury**

<b>Yvan RAHBÉ</b> Directeur de Recherche, INRAE (Lyon)	Président
<b>David RENAULT</b> Professeur, Université de Rennes	Rapporteur & Examineur
<b>Denis THIÉRY</b> Directeur de Recherche, INRAE (Bordeaux)	Rapporteur & Examineur
<b>David SIAUSSAT</b> Maitre de Conférences, Sorbonne Université	Examineur

**Direction de la thèse**

<b>Frédéric MARION-POLL</b> Professeur, AgroParisTech	Directeur de thèse
<b>Ghozlene MEKHOLOUFI</b> Maitre de Conférences, Université Paris-Saclay	Co-encadrante
<b>Amir YASSIN</b> Chargé de recherche, CNRS (Université Paris-Saclay)	Invité



# Remerciements

Ça y est c'est la fin ! 4 ans passés sur cette thèse et maintenant j'en vois le bout. Mes sentiments sont partagés, d'un côté je suis contente que se soit fini pour passer à un autre chapitre de ma vie, mais 4 ans c'est long et j'ai connu des gens qu'il me fera bizarre de ne plus voir quotidiennement.

Tout d'abord, je voudrais remercier Frédéric Marion-Poll. Merci d'avoir accepté de me prendre en stage de M2 et d'avoir cru en moi pour poursuivre sur une thèse, j'ai beaucoup appris auprès de vous. Merci de m'avoir soutenue, motivée et guidée tout au long de cette thèse et particulièrement dans la dernière ligne droite qu'a été l'écriture. Entre vos chutes à vélo et les miennes à cheval, je pense qu'on a formé une bonne équipe de cassés et que nous en avons fait voir de toutes les couleurs à Béatrice !

Ensuite, je voudrais remercier Ghazlene Mekhloufi. Merci d'avoir accepté la collaboration que Frédéric vous a proposée et d'avoir apporté le monde de la formulation et des nano-émulsions à mes connaissances.

Merci au laboratoire EGCE, au pôle comportement, et aux directrices successives, Catherine Montchamp-Moreau et Laure Kaiser-Arnault, de m'avoir accueillie à Gif et de m'avoir permis d'y effectuer mon projet de thèse. C'est un laboratoire avec une ambiance de travail particulièrement agréable et j'espère pour les futurs doctorants que ça ne changera en rien une fois sur le plateau de Saclay.

Merci à Nicolas Meunier et Phillippe Lucas d'avoir constitué mon comité de suivi de thèse. Nous nous sommes vus peu, mais les échanges que nous avons eus ont toujours été très constructifs et positifs pour moi.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon jury de thèse, David Renault et Denis Thiéry pour avoir accepté d'être rapporteurs. Un grand merci aussi à David Siaussat, Yvan Rahbé et Amir Yassin d'avoir accepté d'être examinateurs ou invités.

Béatrice. Un grand, grand, grand merci !! Merci de m'avoir montré certaines techniques comme les injections et de m'avoir soutenue quand les aiguilles ne voulaient se mettre correctement ! Merci aussi de m'avoir aidée avec mon stock de mouches et toutes les questions techniques que j'ai pu avoir. Mais surtout un grand merci à toi pour toutes les discussions et le soutien personnel que tu m'as apporté. Je ne suis pas quelqu'un qui parle beaucoup de mes sentiments mais je sais que ça me fera un grand vide une fois partie du labo.

Céline, qu'est-ce que nous avons bien rigolé ! J'ai été aussi ravie de t'apprendre le multiCAFE, même si tu es encore très loin de mes records. Sylvie, merci des discussions que nous avons pu partager avec souvent comme sujet, les chats.

À tous les doctorants et stagiaires qui se sont succédés au labo et avec qui j'ai pu partager plein de choses, un grand merci. Florian, Hanna, Cécile, Romain, Andréas, vous êtes passés avant moi et j'ai pris exemple sur vous. Ça fait plus d'un an maintenant que je ne me suis pas entraînée en ping-pong, et si Romain ou Florian étaient encore là ça ne se serait pas passé comme ça. Les parties de molkky-bières (#teamdroso !) aux beaux jours sont un souvenir qui fait que je ne vous oublierai pas et que ce labo est super pour les étudiants. Merci Julia de m'avoir fait découvrir le racketlon et ces week-ends de compétition dans toute la France que nous avons passé à gagner, ou pas...

Maroua, Inoussa, Claudia et Erina, merci de m'avoir supportée dans le bureau. Vous avez été de supers colocataires et nous avons eu des échanges privilégiés. Marie, tous ces retours en RER nous ont permis de mieux nous connaître et de beaucoup nous apprécier. Erina, nous avons eu tellement de discussions sur plein de sujets que ça me fera bizarre de ne plus te voir régulièrement.

Pénélope et Jérémy, les deux autres membres de l'équipe de Fred ! Merci du soutien lors de ces derniers mois. J'espère que le déménagement ne sera pas trop la galère pour vous. Maxime, Joseph, Baptiste, Héloïse, Siddharth, Etienne, Malena et tous les autres, bon courage pour vos thèses qui sont à différents niveaux d'avancement. J'espère que je n'ai oublié personne, mais je pense que si...

Merci à tous mes amis qui m'ont régulièrement posé les questions tant redoutées « alors ça avance comment la thèse ? Tu finis quand ta thèse ? ». Merci à la bouteille du mercredi et à la Sheva de m'avoir permis de décompresser entre amis et de bien rigoler même de nos chutes.

Enfin, je voudrais remercier ma famille. Merci de toujours être là et de m'avoir soutenue même si vous ne connaissez pas grand-chose à ce milieu. J'avais dit qu'il aurait aussi le droit à son petit mot, alors je ne mens pas, merci Mushu ! Mon petit chaton qui est là depuis le début de cette thèse, parfois trop près de moi et qui a été d'un gros réconfort moral.

Je voudrais finir par dire que je pense à mon grand-père et que j'aurais aimé qu'il soit là aujourd'hui, même si je sais qu'il est fier de moi.



# TABLE DES MATIERES

---

Introduction.....	9
1. Amertume et toxicité.....	9
a. L'amertume.....	9
b. Composés secondaires des plantes.....	13
c. La toxicité.....	16
d. Détoxification.....	17
2. Le système gustatif.....	21
a. Organisation générale du système gustatifs chez les insectes.....	21
b. Système gustatif chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	22
c. Modalités gustatives détectées par les récepteurs gustatifs (GRs) du proboscis 26	
d. Plasticité du système gustatif aversif.....	28
3. Approches expérimentales et questions.....	29
a. Mesure de la consommation.....	29
b. Stratégies de masquage du goût amer dans les domaines alimentaire et pharmaceutique.....	32
c. Objectifs et démarche.....	36
Chapitre 1 : Choix alimentaire à court terme.....	43
1. Introduction.....	45
2. Material and methods.....	47
3. Results.....	52
4. Conclusion/Discussion.....	61
5. References.....	63
Chapitre 2 : Alimentation et survie sur milieu amer.....	69
1. Introduction.....	71



2. Materials and methods .....	73
3. Results .....	77
4. Conclusion/discussion.....	87
5. Supplementary figures .....	90
6. References.....	93
Chapitre 3 : Masquage du goût amer .....	99
1. Introduction.....	101
2. Materials & Methods.....	103
3. Results .....	106
4. Conclusion.....	114
5. Supplementary figures .....	116
6. References.....	117
Discussion et perspectives.....	123
1. Tests de consommation.....	124
2. Choix alimentaire à court terme .....	126
3. Alimentation et survie sur milieu amer.....	128
4. Masquage du goût amer.....	130
5. Conclusion Générale .....	131
Bibliographie générale.....	135

Liste des tables :

Table 1 : Amertume et toxicité potentielle de la nourriture dans le régime alimentaire des mammifères carnivores, omnivores et herbivores (adapté de Glendinning 1994) .....	12
Table 2 Hormetic effect .....	80
Table 3: Statistical analysis.....	116

## Liste des figures :

Figure 1 : Schéma des différentes voies du métabolisme des xénobiotiques .....	19
Figure 2 : Organisation du système gustatif chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	23
Figure 3 : Schéma d'une sensille gustative.....	23
Figure 4 : Distribution des sensilles gustatives sur le proboscis de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	24
Figure 5 : Schéma des différents types de GRN dans les sensilles L, S et I.....	25
Figure 6 : Liste des gènes de GR exprimés dans les sensilles gustatives du proboscis.....	27
Figure 7 : MultiCAFE développé au laboratoire.....	31
Figure 8 : Structures chimiques des molécules testées .....	37
Figure 9 : MultiCAFE device.....	49
Figure 10 : Analysis of a multiCAFE experiment.....	50
Figure 11 : Consumption time course of flies given access to 2 capillaries in a choice experiment .....	53
Figure 12 : <i>Drosophila's</i> consumption after 2 hours shows their avoidance of bitter tastants.....	54
Figure 13 : Preference index and total consumption .....	57
Figure 14 : Scales of bitterness from preference index.....	58
Figure 15 : Gr66a ex83 and W1118 bitter consumption after 2 hours .....	60
Figure 16 : MultiCAFE device .....	75
Figure 17: Survival of the flies in three conditions .....	78
Figure 18: Lethal concentration 50 (LC50).....	81
Figure 19: Consumption of denatonium by flies.....	83
Figure 20 : Relationship between survival and the quantity of toxic molecules consumed....	84
Figure 21 : Relationship between survival and the quantity of sucrose molecules consumed.....	85
Figure 22 : Correlation between toxicity and bitterness .....	86
Figure 23 : Survival over time when flies are fed on an agar, sucrose and bitter solide medium .....	90
Figure 24 : Survival over time after injection of bitter molecules.....	91
Figure 25 : Survival over time when flies are fed on liquid medium in the multiCAFE device.....	92
Figure 26 : Chemical structure of oleuropein.....	102
Figure 27 : Average consumption in a choice experiment between a sucrose (30mM) and a oleuropein/sucrose solution.....	107

Figure 28: Survival of flies and their consumption of oleuropein in the multiCAFE device....	108
Figure 29 : Survival curves after the injection of oleuropein in the abdomen of flies and the lethal concentration 50 of oleuropein and caffeine.....	110
Figure 30 : Choice experiments between sucrose solution at 30 mM concentration (blue curve) and a mixture of 1% $\beta$ -lg and 30mM-sucrose solution (orange curve). ....	111
Figure 31 : Hiding of the bitter taste of oleuropein.....	113
Figure 32: Preference index of oleuropein .....	114

# Abréviations

ABC : ATP binding cassette

ATP : Adénosine Triphosphate

$\beta$ -lg :  $\beta$ -lactoglobuline

CAFE : Capillary Feeder

CL : Concentration létale

CS : Canton S

CYP : Cytochromes P450

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GR : Gustatory Receptor

GRN : Gustatory Receptor Neuron

GST : Glutathione-S-transférase

IC : Intermediary Concentration

IR : Iontropic Receptor

LC : Lethal concentration

OBP : Odor Binding Potein

PER : Proboscis Extension Response

PI : Preference Index

PPK : Pickpocket

RH : Relative Humidity

TRP : Transient Response Potential



# **Introduction**



# INTRODUCTION

---

Dans ce chapitre je vais m'intéresser à l'amertume et la toxicité, et plus particulièrement à la relation qu'il existe entre ces deux qualificatifs. Je parlerai tout d'abord du goût amer et chez les animaux en général. Puis je parlerais des composés secondaires des plantes qui sont une source naturelle de composés amers mais aussi toxiques car ils participent à la défense des plantes contre les ravageurs. Ensuite, je vais définir ce qu'est la toxicité, et par quels moyens les insectes, et plus particulièrement *Drosophila melanogaster*, peuvent lutter contre cette dernière. Enfin, j'exposerai l'organisation du système gustatif chez la drosophile. Ces éléments établissent les bases théoriques sur lesquelles je me suis appuyée pour aborder les questions auxquelles j'ai essayé de répondre au cours de ma thèse, questions qui visent à savoir s'il existe une relation entre amertume et toxicité chez *Drosophila melanogaster*.

## 1. AMERTUME ET TOXICITE

### a. L'AMERTUME

#### i. L'amertume dans la vie de tous les jours

L'amertume est très généralement considérée comme une première ligne de défense contre les poisons. En effet, pour l'Homme, la plupart des poisons sont perçus comme amers, comme par exemple la strychnine qui est une neurotoxine très puissante (Behrens and Meyerhof 2006). Dès notre plus jeune âge, nous sommes confrontés à la présence d'amertume dans notre quotidien. L'amer est un goût que l'on retrouve dans certains aliments végétaux comme le pamplemousse ou les choux de Bruxelles et nous avons appris à plus ou moins le tolérer car cette amertume est liée à des aliments qui sont bénéfiques pour notre santé.

Certains goûts amers sont parfois recherchés. Ainsi, la caféine ou la théine qui sont issues de végétaux ne sont pas particulièrement qualifiées de bénéfiques pour l'organisme mais elles sont pourtant très présentes et consommées dans notre société malgré leur goût amer (Fibrianto *et al.* 2021). Ce sont les propriétés excitantes du café et du thé qui sont recherchées, au point que de la caféine est ajoutée dans les boissons énergisantes de synthèse (Keast 2008).



Le goût amer de beaucoup de légumes représente un frein à leur consommation et l'industrie agroalimentaire recherche activement des moyens pour masquer le goût des molécules impliquées ou en diminuer la concentration.

L'amertume est aussi très présente dans les médicaments car beaucoup de principes actifs créent ce goût malgré les efforts fournis par l'industrie pharmaceutique pour le minimiser. Par exemple, la quinine, dont l'amertume est reconnue, est le principe actif extrait de l'écorce du cinchona (*Cinchona officinalis*), un arbre des montagnes du Pérou, qui est un remède très efficace contre le paludisme et dont les européens firent la connaissance lors de la découverte de l'Amérique du Sud au XVème siècle (Garcia 2020). Au Japon, le lien entre amertume et effets bénéfiques des médicaments est resté très fort et se retrouve dans de nombreuses expressions populaires comme « a good medicine tastes bitter » (良薬は口に苦し). L'amertume des produits médicamenteux est pourtant un frein à leur ingestion, en particulier pour les enfants, et l'industrie pharmaceutique a développé des méthodes pour masquer cette amertume.

Les molécules amères peuvent être très utiles afin de repousser et protéger les enfants ou adultes contre l'ingestion de produits dangereux, comme l'éthanol dénaturé (Henderson *et al.* 1998) ou des produits ménagers. Le benzoate de dénatonium, commercialisé sous le nom de Bitrex ®, en est le meilleur exemple. En effet, il est ajouté dans le gel douche pour enfants, les brumes parfumées, le bain moussant, l'antigel, etc..., pour prévenir du danger d'ingestion accidentelle<sup>1</sup>. Il est aussi utilisé dans certains vernis ayant pour but d'empêcher de se ronger les ongles.

## ii. Définition sensorielle de l'amertume par l'Homme

L'amer est une sensation gustative définie par l'Homme qui peut provoquer un enchaînement de réflexes aversifs immédiats et stéréotypés qui vont de l'arrêt de la prise de nourriture au retrait de la langue, la bouche ouverte, l'augmentation du temps de déglutition, un rythme cardiaque plus bas, et la nausée pouvant même parfois aller jusqu'au vomissement (Davis *et al.* 1986).

---

<sup>1</sup> <https://incibeauty.com/ingredients/2377-denatonium-benzoate>

Ces réponses de rejet consécutives à la détection d'un stimulus amer sont innées chez les vertébrés. Les nouveaux nés peuvent faire une distinction dans la nourriture qui leur est présentée (Desor *et al.* 1975; Ganchrow *et al.* 1983; Ventura and Worobey 2013) mais ils évitent l'amertume. Il en est de même chez des nouveaux nés d'autres Vertébrés, comme le singe, le rat ou la souris.

Chez l'Homme, bien que nous soyons souvent en contact avec l'amertume, c'est plutôt à des niveaux modérés et en tout cas, cette amertume n'indique pas une toxicité létale. Parmi les aliments que nous consommons, les viandes et les poissons en sont généralement dépourvus et ce sont principalement les légumes et les fruits ou les graines qui peuvent être amers. Les végétaux que nous consommons sont généralement sélectionnés pour leur goût acceptable et leur innocuité, ou récoltés à un stade de maturité où les défenses de la plante sont moins intenses, ou encore la préparation alimentaire qui en est faite élimine le poison, comme dans le cas du manioc. De manière culturelle, nous sommes conduits à tolérer voire à apprécier des goûts amers dans certains aliments ou boissons consommés pour leurs effets post-ingestion (l'éveil pour la caféine par exemple) ou pour des raisons culturelles. Enfin, la sensibilité à l'amer décline avec l'âge chez l'homme.

### **iii. Pourquoi détecter l'amertume ?**

L'amertume est l'une des modalités sensorielles détectées par le système gustatif. Chez l'homme, ces modalités sont au nombre de 5 ; sucré, amer, acide, salé et umami (Bachmanov and Beauchamp 2007). De manière très générale, chez l'homme et chez tous les animaux, le système gustatif permet de « prédire » la valeur nutritive et/ou le danger que représentent des aliments sur le point d'être ingérés. Cette « prédiction » induit non seulement des comportements d'acceptation ou de rejet, mais aussi induit des réactions physiologiques comme la salivation, la sécrétion de sucs gastriques, etc.

Détecter et éviter de consommer des aliments amers permet de se protéger d'une intoxication potentielle. En effet, il a été montré que les mammifères, quel que soit leur régime alimentaire, pouvaient être confrontés à une source de nourriture amère et potentiellement toxique (**Tableau 1**) (Glendinning 1994; Torregrossa *et al.* 2012).

Table 1 : Amertume et toxicité potentielle de la nourriture dans le régime alimentaire des mammifères carnivores, omnivores et herbivores (adapté de Glendinning 1994)

C = carnivores, O = omnivores, B = brouteurs, R = ruminants.

Type de nourriture		Amère et toxique (probabilité)	Consommateurs principaux	
<b>Vertébrés, Invertébrés</b>	Espèces cryptiques	Faible	C, O	
	Espèces aposématiques	Forte	O	
<b>Végétaux</b>	Arbustes, arbres	Graines	Forte	O, R
		Fruits immatures	Forte	O, R
		Fruits matures	Faible	O, R
		Tubercules	Forte	O, R
		Feuilles	Forte	R
	Herbes	Immature	Forte	B
		Mature	Faible	B

#### iv. Cellules gustatives et récepteurs gustatifs

Chez l'homme et les Vertébrés, l'amertume est principalement détectée par des cellules spécialisées situées dans la bouche. Celles-ci sont équipées de récepteurs membranaires, ou récepteurs gustatifs, en nombre variable selon les espèces et le mode de vie, chacun de ces récepteurs étant sensible à une gamme de ligands plus ou moins large. Chez l'homme, on dénombre environ 30 récepteurs capables de détecter des molécules amères, alors qu'un seul est dévolu à la détection des sucres (Chandrashekar *et al.* 2000; Matsunami *et al.* 2000; Nelson *et al.* 2001).

Il existe des variations liées aux spécialisations alimentaires. L'hypothèse la plus communément acceptée est que les herbivores possèdent plus de récepteurs à l'amer parce que les plantes contiennent plus de composés toxiques que les tissus animaux (Li and Zhang 2014). A l'inverse, les animaux avec un régime alimentaire spécialisé perdent des récepteurs. Ainsi, les baleines et les chauves-souris hématophages ont perdu, au cours de leur évolution, un ou plusieurs gènes de récepteurs gustatifs (Feng *et al.* 2014; Hong and Zhao 2014) car elles ne rencontrent

pas de goût amer dans leur alimentation. Le goût du sucre peut aussi se perdre, par exemple chez des espèces carnivores comme le chat ou le tigre (Li *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2012).

#### **v. Qui détecte l'amertume ?**

Les vertébrés ne sont pas les seuls à avoir cette capacité de détection de l'amer (Bergvall and Leimar 2005), les invertébrés sont aussi équipés pour percevoir l'amertume, et plus particulièrement les invertébrés herbivores. Ils sont en contact avec le goût amer par le biais des plantes qu'ils consomment et ils auraient une capacité plus importante que les organismes qui sont peu ou rarement confrontés à l'amer, à détecter de telles molécules (Bernays *et al.* 1997; Xu *et al.* 2016). En effet, la majorité des plantes produisent des composés secondaires amers et toxiques leur permettant de se défendre contre les espèces qui les attaquent pour se nourrir (Bernays and Chapman 1994; Schoonhoven *et al.* 2005).

Il a été observé que les insectes herbivores spécialistes, c'est-à-dire qui se nourrissent sur un seul type de plante, sont beaucoup plus sensibles à l'amer car ils sont confrontés à peu de composés amers alors que c'est l'inverse pour les insectes généralistes (Singer *et al.* 2002). Comme ceux-ci fourragent sur un grand nombre de plantes, si leur seuil d'évitement était trop bas, ils seraient amenés à éliminer trop de sources de nourritures potentielles (Bernays *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2013a).

#### **b. COMPOSES SECONDAIRES DES PLANTES**

Si les animaux, en particulier herbivores, évitent des substances amères et toxiques provenant des plantes, quelles sont ces substances et quels rôles jouent-elles dans leur biologie ?

##### **i. Les métabolites secondaires des plantes**

Grâce à la photosynthèse, les plantes élaborent un grand nombre de composés chimiques qui ont différents rôles dans leur physiologie. Les métabolites primaires (les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les glucides simples) sont indispensables à la vie, au développement et à la reproduction de la plante. De ces métabolites primaires découlent les métabolites secondaires qui ont des fonctions variées (Pagare *et al.* 2015; Jost and Jost-Tse

2016). A l'inverse des composés primaires, les composés secondaires sont non-essentiels à la croissance, au développement et à la reproduction des plantes. Beaucoup de composés secondaires sont connus à ce jour, et trois grandes familles émergent, les alcaloïdes, les terpènes (plus de 40 000 structures connues) ainsi les composés phénoliques avec leurs dérivés (Aharoni *et al.* 2005; Howe and Jander 2008).

## **ii. L'amertume et la toxicité des métabolites secondaires**

Les alcaloïdes sont des composés secondaires très bien connus chez les mammifères, par exemple, la nicotine, la caféine ou la quinine sont des alcaloïdes qu'ils peuvent rencontrer. Le point commun de ces molécules est qu'elles sont amères, mais les terpènes et les composés phénoliques, sont aussi connues pour déclencher des phénomènes d'évitement (Belitz and Wieser 1985).

L'amertume n'est toutefois pas la seule caractéristique des composés secondaires des plantes. En effet, la plupart de ces composés sont aussi toxiques car ce sont des composés impliqués dans différents mécanismes de défense contre les herbivores comme l'antibiose et l'antixénose (Lambdon and Hassall 2005).

L'antibiose est une association entre deux ou plusieurs organismes qui inhibent la biologie d'au moins l'un d'entre eux, ou une association antagoniste entre les organismes et les composés chimiques produits par l'autre. L'antixénose décrit la situation où l'attraction du ravageur pour une plante dépend de la qualité de l'hôte et /ou des composés volatiles ou gustatifs.

Les substances de défense peuvent avoir un effet insecticide ou anti-nutritif (Painter 1951). Elles peuvent être exprimées de manière constitutive (toujours présentes à l'intérieur de la plante, par exemple stockées dans des vacuoles), ou induites sous l'action de stimulus extérieurs.

## **iii. Quelques métabolites secondaires toxiques**

La nicotine est un métabolite secondaire produit par les plantes de la famille des solanacées. C'est une molécule qui agit sur les récepteurs à l'acétylcholine dans le système nerveux des animaux et elle est la plupart du temps toxique chez les insectes folivores. Mais,

ce n'est pas son seul effet chez les insectes puisque la nicotine induit une neurotoxicité, elle a aussi une action anti-appétante et elle bloque la digestion des protéines (Liu *et al.* 2018; Morris *et al.* 2018).

Les saponines, ne sont pas toxiques pour les humains, elles sont même bénéfiques, mais pour les insectes, elles ont un effet insecticide. Lorsque les larves de *Spodoptera littoralis* se nourrissent sur un milieu riche en saponine, extraite de l'écorce de *Quillaja saponaria*, leur mortalité augmente et il y a un retard de développement (Hussain *et al.* 2019; Sang *et al.* 2019). Les composés dont nous venons de parler ont des effets post-ingestifs immédiats car ils agissent sur le système nerveux mais il existe des métabolites secondaires ayant des effets sur le long terme.

En effet, certains métabolites secondaires des plantes peuvent avoir une action sur le long terme car ce sont des analogues d'hormones auxquelles les insectes ou les vertébrés sont sujets. Les phytoestrogènes qui sont présents dans le soja ont une activité similaire aux hormones des vertébrés (Terreaux *et al.* 2003).

Pour les insectes, ce sont les phytoecdystéroïdes qui sont majoritairement synthétisés dans les jeunes tissus et les graines, qui sont les plus connus (Dinan 2001). Lorsqu'ils sont ingérés par les insectes, les effets peuvent varier d'une mue incomplète à la mort de la larve (Marion-Poll *et al.* 2009). Les conséquences de l'ingestion de phytoecdystéroïdes sont principalement connues chez les larves, mais comme l'ecdysone est impliquée dans la fertilité et la reproduction chez les mâles, il est probable qu'elle joue un rôle sur la fitness des insectes (Herndon *et al.* 1997). Toutefois, comme il s'écoule du temps entre l'ingestion et les symptômes observables, il est compliqué pour l'individu de faire le rapprochement. C'est pourquoi une stratégie d'évitement est très certainement sélectionnée par l'évolution. Dans le cas contraire, il y a ambiguïté, car les symptômes postingestifs peuvent alerter l'individu qui peut « apprendre » à éviter des stimuli (olfactifs, visuels, sonores, gustatifs) précédant l'intoxication.

## c. LA TOXICITE

### i. Comment peut-on définir la toxicité ?

Il existe plusieurs définitions de la toxicité qui peut être aiguë, chronique, subaiguë ou subchronique, que ce soit au niveau d'un individu ou bien d'une population. La toxicité d'une molécule dépend principalement de la dose et de la durée d'exposition auxquelles l'organisme/la population a été exposé.

De plus, il est possible d'avoir un effet cumulatif et dépendant du contexte si d'autres molécules sont présentes dans le milieu ou si elles interagissent entre elles. Toutefois, la plupart du temps, c'est la dose-dépendance de l'exposition qui prévaut le plus fortement dans la toxicité <sup>2</sup>.

La toxicité d'une molécule peut influencer sur les différents paramètres qui constituent la fitness d'un individu, c'est-à-dire la survie et la capacité d'avoir une descendance. Dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons seulement à la survie car nous allons essayer de la relier à la consommation.

### ii. Comment est-ce que la toxicité est-elle détectée par l'individu ?

Si la toxicité de composés ingérés est détectée, c'est *a posteriori*, par l'apparition de symptômes post-ingestion. Ces symptômes peuvent être immédiats (malaise, vomissement, tremblements) ou apparaître avec un délai, on parle à ce moment-là d'empoisonnement (Hart 1988; Millman 2007). Il peut aussi y avoir des effets insidieux sur la reproduction (par induction de stérilité) ou bien sur l'apparition de cancers plusieurs années après (Chang *et al.* 2017). Les vertébrés sont capables de détecter des symptômes d'intoxication ou d'empoisonnement mais on est moins sûr que cela soit le cas chez les insectes bien que plusieurs études le suggèrent (Ayestaran *et al.* 2010; Wright *et al.* 2010; Hurst *et al.* 2014).

En ce sens, disposer de repères sensoriels permettant de détecter de telles substances confère un avantage évident. Cependant, comme le système sensoriel s'appuie sur des signaux

---

<sup>2</sup>[https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information\\_requirements\\_part\\_e\\_en.pdf/1da6cadd-895a-46f0-884b-00307c0438fd](https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information_requirements_part_e_en.pdf/1da6cadd-895a-46f0-884b-00307c0438fd)

sensoriels, et en l'occurrence, il s'agit de caractères chimiques des molécules pour la gustation, ces caractères sont complètement dissociés des caractères qui rendent les molécules toxiques. Par essence donc, la détection sensorielle est nécessairement prédictive et imparfaite. Une des conséquences de cette prédictibilité indirecte est que les informations délivrées par le système sensoriel doivent être plastiques et adaptables.

Cette plasticité se rencontre au niveau de l'individu, qui peut associer des stimuli sensoriels avec une expérience gustative aversive. C'est le principe de l'apprentissage associatif démontré par Pavlov chez le chien. Les animaux et l'homme peuvent également associer des stimuli sensoriels, notamment gustatifs mais aussi d'autres modalités, à un malaise digestif. Il ne s'agit alors pas d'apprentissage associatif car le malaise peut être détecté plusieurs heures après l'ingestion. Par contraste avec l'apprentissage associatif, cet apprentissage ou aversion alimentaire, reste très stable dans le temps et implique des circuits nerveux différents.

Les mécanismes d'ajustement liés à l'expérience d'un individu (qui peuvent être transmis socialement), ne permettent cependant pas d'expliquer l'adaptation des organismes et du système gustatif à des molécules qui ont un effet à plus long terme, provoquant par exemple une stérilité. Dans ce cas, il est légitime de postuler que les individus qui possèdent des récepteurs gustatifs (ou des récepteurs d'autres modalités sensorielles) qui leur permettent d'éviter cette toxine seront avantagés. En d'autres termes, l'hypothèse la plus vraisemblable du lien apparent trouvé entre amertume et toxicité, est que cette corrélation est mise en place au cours de l'évolution. Plus une molécule toxique est rencontrée depuis longtemps par un organisme, meilleure est la corrélation. Et inversement, plus la molécule est inconnue ou connue depuis peu, moins la corrélation entre amertume et toxicité doit être bonne.

#### d. DETOXIFICATION

##### i. Les xénobiotiques

Tout composé naturel ou de synthèse auquel un être vivant est confronté peut se révéler toxique pour son organisme. Dans la littérature sur la détoxification, il est donné le nom de xénobiotique à toute molécule étrangère à un organisme et qui n'a pas de fonction



physiologique vitale. Leur nature est variée, elle peut aller des polluants environnementaux, aux médicaments et aux composés secondaires des plantes.

Ces xénobiotiques peuvent entrer dans les organismes par différentes voies : orale, cutanée ou respiratoire. Leur dégradation entraîne une accumulation de déchets xénobiotiques qui peut être eux-mêmes toxiques même si le produit initial ne l'était pas. Dans notre cas, si ces composés ont réussi à passer la barrière orale, l'organisme dispose d'enzymes permettant de dégrader ou de changer les propriétés des molécules afin de faciliter leur élimination. La classe la plus connue est celle des cytochromes 450 (P450 ou CYP).

## **ii. Le métabolisme des xénobiotiques**

La détoxification des xénobiotiques se fait en trois phases. Deux phases où des enzymes entrent en jeu, et la dernière qui est une phase d'excrétion par des transporteurs **(Figure 1)** (Amezian *et al.* 2021).

Les enzymes de phase I réalisent l'étape de fonctionnalisation qui consiste à greffer un groupement fonctionnel sur le xénobiotique, principalement catalysé par les monooxygénases à cytochromes P450. Le métabolite issu de la réaction présente les propriétés nucléophiles ou électrophiles nécessaires à l'étape suivante de conjugaison (Nebert and Dalton 2006). Les enzymes de phase II prennent en charge les métabolites issus de l'étape de fonctionnalisation, ou bien des molécules possédant déjà un groupement fonctionnel hydrophile. Généralement, elles catalysent la conjugaison d'un groupement polaire qui peut être selon l'enzyme et l'organisme un acide glucuronique (UDP-glucuronosyltransférases), le glutathion (Glutathion-S-transférases) ou un groupe sulfate (Sulfotransférases). Lors de la phase III, les métabolites conjugués hydrophiles sont excrétés hors de la cellule, ce qui nécessite l'intervention des protéines membranaires appartenant à la famille des transporteurs ATP-dépendant de type ABC (Xu *et al.* 2005; Nakata *et al.* 2006).

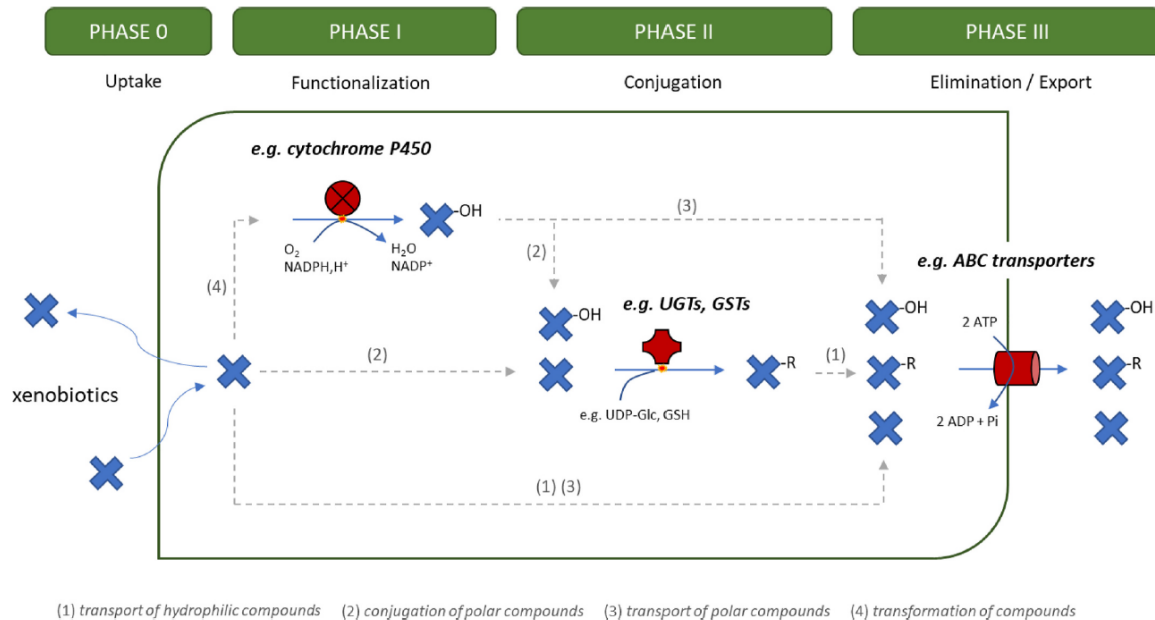


Figure 1 : Schéma des différentes voies du métabolisme des xénobiotiques

Les enzymes de Phase I et de Phase II qui prennent en charge la détoxification sont incarnées par les réactions catalysées respectivement par les monoxygénases à cytochrome P450 (P450) et l'UDP-glucuronosyltransférases (UGTs). Les voies d'élimination montrées peuvent fonctionner simultanément, mais en fonction du xénobiotique, des voies individuelles peuvent dominer. UGT : UDP-glucuronosyltransférase, GST : Glutathion-S-transférase, ABC : ATP-binding Cassette. Traduit de Amezian et al., 2021.

### iii. Cytochromes P450 et la résistance conférée aux insectes par les systèmes de détoxification

Les insectes ravageurs/nuisibles sont connus pour s'adapter à des composés de synthèse ou naturels utilisés pour lutter contre eux et ainsi développer des résistances (Alyokhin and Chen 2017). Des changements à plusieurs points clés du métabolisme peuvent permettre aux insectes de passer outre les insecticides ou les composés secondaires des plantes. La superfamille des cytochromes P450 (CYP) a très souvent un rôle majeur dans cette résistance (Zhu *et al.* 2016).

*Drosophila melanogaster* possède 85 gènes codant pour une CYP et 5 pseudogènes dont l'expression est majoritaire dans les corps gras et les tubules de Malpighi, qui équivalent aux reins chez les mammifères (Tijet *et al.* 2001; Yang *et al.* 2007). Plusieurs études ont démontré l'importance de Cyp6g1 dans la résistance à différentes molécules, principalement le

dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le néonicotinoïde imidaclopride (Daborn *et al.* 2001; Daborn *et al.* 2002). Les CYP sont activées suite à l'ingestion de composés toxiques pour aider à leur élimination. Si une mutation favorable est présente dans un gène de CYP ou un de ses promoteurs et mène à une surexpression des systèmes de détoxification, alors les insectes portant la mutation seront avantagés en présence de ce composé toxique (Brun *et al.* 1996; Bogwitz *et al.* 2005; Schuler and Berenbaum 2013). Toutefois, la majorité des mutations est défavorable à la survie d'une espèce et n'est pas sélectionnée.

Toutefois, les CYP ne sont pas les seuls gènes sur la voie de détoxification, qui lorsqu'ils ont une expression modifiée, confèrent une résistance à des insecticides. Les transporteurs ABC ainsi que les GST peuvent aussi participer à la résistance à des substances nocives (Tu and Akgül 2005; Merzendorfer 2014).

Pour conclure, il y existe deux grandes voies de résistance aux xénobiotiques, une augmentation de l'expression des systèmes de détoxification et une mutation de la cible de la toxine, ce qui est beaucoup plus rare. Bien que ces changements soient bénéfiques pour les organismes, ils ont souvent un coût énergétique qui, au final, peut avoir un impact sur la fitness.

#### **iv. Toxicité et systèmes sensoriels ?**

Peu de données existent sur l'impact des substances toxiques sur les systèmes sensoriels. On sait cependant que les tissus olfactifs et gustatifs sont bien protégés des substances xénobiotiques par des enzymes de détoxification produites par les cellules accessoires de l'épithélium olfactif, peut-être par des composés présents dans la salive et aussi par la production d'un mucus riche en odorant-binding proteins (OBP). Chez les insectes, de nombreux travaux, par exemple de Martine Maïbèche, Thomas Chertemps et David Siauxsat et leurs collaborateurs (Bozzolan *et al.* 2014; Younus *et al.* 2017; Durand *et al.* 2018), montrent que les sensilles olfactives expriment des enzymes de détoxification et des OBP (Steiner *et al.* 2017), et que le niveau d'expression de ces enzymes augmente après une exposition par exemple à un insecticide, induisant parfois des effets positifs de type hormétique (Malbert-Colas *et al.* 2020).

Ces fonctions de protection n'ont par contre pas un rôle prédictif et permettent seulement aux systèmes sensoriels de demeurer actifs y compris après avoir été exposés à des composés toxiques. Détecter la toxicité d'une molécule est une tâche extrêmement difficile à moins de trouver un moyen « d'exposer les sites sensibles » comme le postulaient Mullin *et al.* (1994). En fait, les systèmes sensoriels ont accès à des paramètres chimiques qui ne sont pas directement liés à la toxicité.

Comment peut-on alors considérer que les substances toxiques sont amères ? Examinons donc à présent comment fonctionne le système gustatif pour mieux comprendre comment les substances sapides et toxiques peuvent être détectées.

## 2. LE SYSTEME GUSTATIF

Les interactions entre les êtres vivants et leur milieu sont principalement basées sur les informations que ces êtres vivants reçoivent du monde extérieur. Ces informations sont détectées par les systèmes sensoriels (le goût, l'odorat, l'ouïe, le toucher et la vue) qui sont adaptés pour percevoir les indices de l'environnement qui sont nécessaires pour optimiser la fitness de chaque espèce (Niven and Laughlin 2008). Contrairement aux autres systèmes sensoriels comme l'olfaction, la vision ou l'audition qui « surveillent » des stimuli provenant de sources distantes (ou proches), le système gustatif est concerné par des stimuli qui sont détectés au contact du corps, tout particulièrement au niveau de la sphère orale.

### a. ORGANISATION GENERALE DU SYSTEME GUSTATIFS CHEZ LES INSECTES

La gustation est une chimioréception de contact qui permet de définir une localisation spatiale de molécules entrées en contact avec une partie spécifique du corps de l'animal. Pendant longtemps, l'hypothèse de travail dominante était que les insectes répondent aux mêmes modalités gustatives que les humains, le sucré, l'amer, l'acide, le salé et l'umami. Mais, contrairement aux vertébrés, les insectes sont capables de détecter également le « goût » de composés lipophiles qui peuvent se trouver à la surface de certaines plantes ou sur la cuticule d'autres insectes grâce à leurs organes gustatifs. Ces molécules peuvent être impliquées dans la communication phéromonale et jouent un rôle très important chez les insectes sociaux. Actuellement, beaucoup de travaux étudient principalement la distinction faite par le système

gustatif des insectes entre composés appétants (par exemple les sucres) et antiappétants (amers).

## b. SYSTEME GUSTATIF CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

### i. Architecture du système gustatif

Chez les insectes, les organes gustatifs ne se trouvent pas seulement sur le proboscis (qui est l'équivalent de la langue) ou les palpes maxillaires et mandibulaires, mais aussi sur les parties qui peuvent être en contact avec le substrat. Cela peut comprendre chez certains insectes, les pattes, les antennes, le bord antérieur des ailes et l'appareil ovipositeur (Liman *et al.* 2014) (**Figure 2**). Contrairement à d'autres insectes, la drosophile n'a pas d'organes gustatifs sur les antennes qui sont quasi exclusivement dévolues à l'olfaction.

Les organes gustatifs des premiers tarse permettent à la drosophile de percevoir des composés en absence d'eau ou les phéromones cuticulaires de partenaires potentiels. De plus, des sensilles de l'ovipositeur jouent un rôle dans la détermination d'un site de ponte adapté. La spécialisation et le dimorphisme sexuel dans la densité des sensilles gustatives donnent des indices sur leur rôle potentiel (Chapman 1982).

Par la suite, nous nous focaliserons sur les sensilles gustatives et les récepteurs gustatifs seulement du proboscis.

### ii. Les sensilles gustatives

A la différence des vertébrés qui ont un unique organe gustatif, les insectes possèdent une multitude d'unités chimiosensorielles individuelles qui se nomment sensilles gustatives et qui ont généralement la forme de soies (Marion-Poll 2020a) (**Figure 3**). Un pore est présent à l'extrémité externe de la sensille, ce qui permet aux molécules d'atteindre les cellules sensorielles. Chaque structure sensillaire est composée de 4 neurones gustatifs (GRN) et 1 mécanorécepteur, dont les axones se projettent dans le ganglion nerveux (Amrein and Thorne 2005).

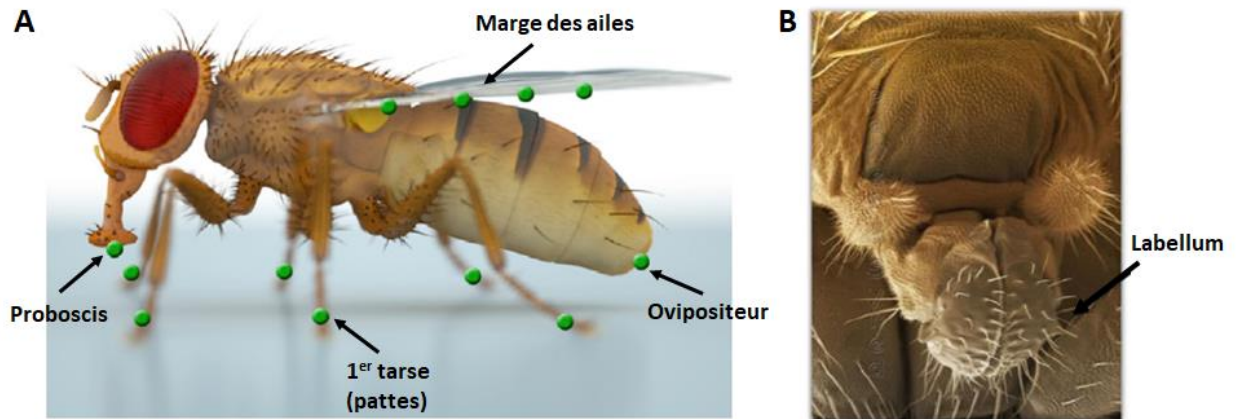


Figure 2 : Organisation du système gustatif chez *Drosophila melanogaster*

(A) – Les points verts correspondent à la localisation des organes gustatifs externes de la drosophile : le proboscis, les tases des pattes, la bordure des ailes et l'ovipositeur (pour les femelles). (B) – Le proboscis, composé de deux labellum recouverts de sensilles gustatives. Adapté de Liman et al., 2014.

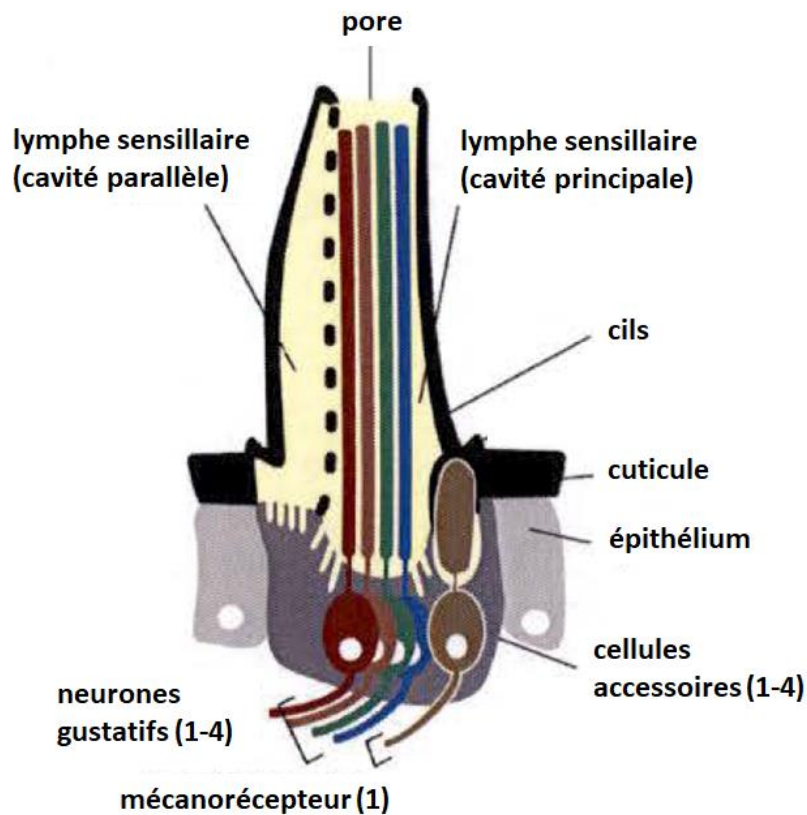


Figure 3 : Schéma d'une sensille gustative

Adapté de Marion-Poll 2020

Chaque labelle du proboscis comporte 31 sensilles au total classées dans 3 catégories différentes en fonction de leur taille, leur morphologie et de la localisation. Les sensilles de type L (pour longue) sont au nombre de 9 et possèdent 4 GRN et 1 mécanorécepteur, tout comme les sensilles de type S (pour short = courte), au nombre de 10. Enfin, les sensilles de type I (pour intermédiaire), au nombre de 12, possèdent seulement 2 GRN et 1 mécanorécepteur (Hiroi *et al.* 2004; Montell 2009; Weiss *et al.* 2011) (**Figure 4**).

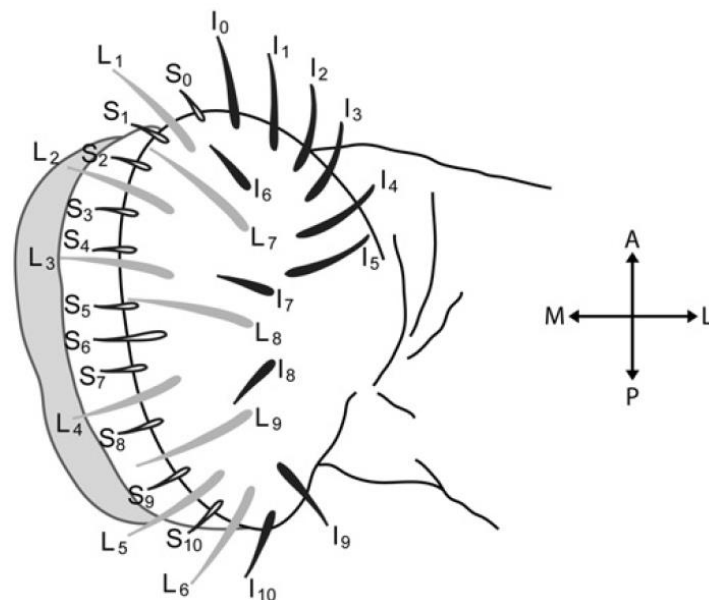


Figure 4 : Distribution des sensilles gustatives sur le proboscis de *Drosophila melanogaster*

L'extrémité du proboscis de la drosophile adulte est constitué de 2 palpes ou labelles, avec chacun 31 sensilles. Les sensilles sont représentées ici en fonction de leur longueur (blanc = sensille courte (S), gris= longue (L), noir = longueur intermédiaire (I)). Sur ce schéma extrait de Weiss *et al.*, 2011, la numérotation diffère un peu de celle de Hiroi *et al.*, 2004.

### iii. Les neurones gustatifs

Les 4 types de neurones gustatifs (GRN) présents dans les sensilles présentent une spécificité de réponse électrophysiologique par rapport à l'eau (W), au sel à basse (L1) ou à haute (L2) concentration, au sucre (S) (**Figure 5**). Comme les sensilles de types L et S possèdent les 4 sortes de GRN, elles répondent au sucre, à l'eau, et à différentes concentrations de sel. La différence est que les sensilles L ne répondent pas à l'amer alors que le S le font. A l'inverse, les sensilles de type I, comme elles ne possèdent que 2 GRN, les S et L2, ne répondent qu'à des stimulus attractifs ou aversifs (Hiroi *et al.* 2004; Ebbs and Amrein 2007).

Dans le labelle, les composés amers sont principalement détectés dans les sensilles de type S et I grâce aux cellules L2 (Meunier *et al.* 2003).

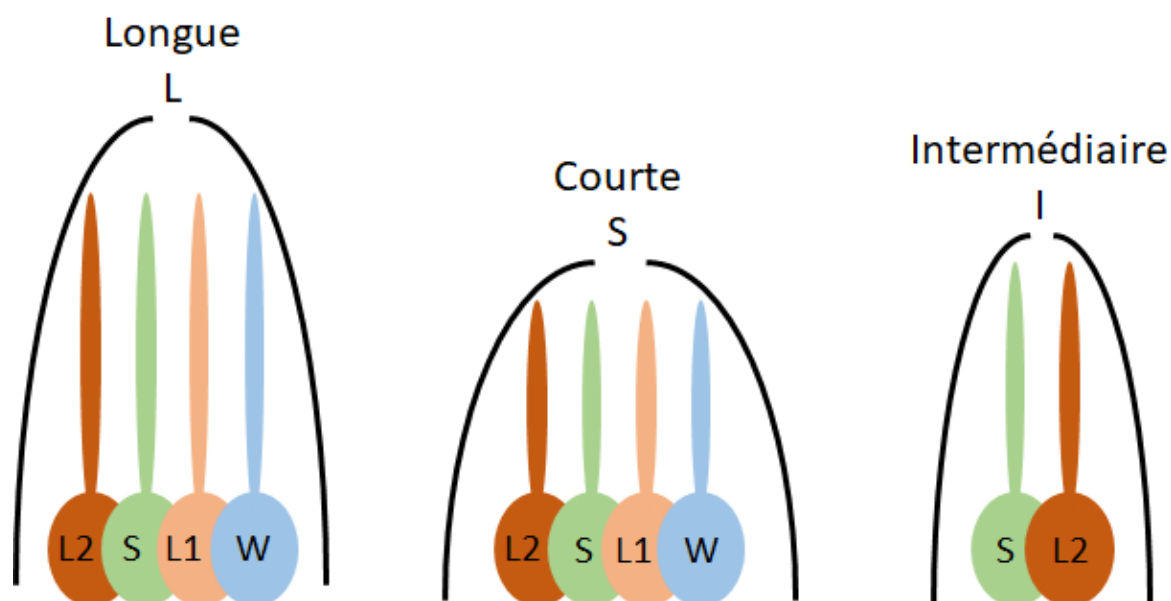


Figure 5 : Schéma des différents types de GRN dans les sensilles L, S et I

Les sensilles de types L et S comportent 4 GRN distincts, qui répondent au sucre (S), à l'eau (W), et aux concentrations faibles (L1) et élevées (L2) de sels. Au contraire, les sensilles de type I n'ont que 2 GRN.

#### iv. Les récepteurs gustatifs

Chez la drosophile, les premiers récepteurs gustatifs de drosophiles ont été découverts par une approche *in silico* (Clyne *et al.* 2000). Depuis, on a identifié 62 gènes codant pour 68 récepteurs gustatifs à 7 domaines transmembranaires chez la drosophile (Clyne *et al.* 2000; Dunipace *et al.* 2001; Scott *et al.* 2001; Thorne *et al.* 2004).

Il existe trois grandes catégories de récepteurs présents dans les neurones gustatifs, les récepteurs gustatifs (GRs), les récepteurs ionotropiques (IRs) (Benton *et al.* 2009) mais aussi d'autres canaux comme les TRP (Transient Response Potential) ou PPK (pickpocket). Toutefois, nous nous intéresserons ici, seulement aux GRs.



## C. MODALITES GUSTATIVES DETECTEES PAR LES RECEPTEURS GUSTATIFS (GRS) DU PROBOSCIS

### i. Les récepteurs au sucre

Les insectes sont attirés par le goût sucré qui leur signale la présence de nutriments essentiels pour leur survie. *Drosophila melanogaster* ne faisant pas exception à cela, et avec une connaissance approfondie de sa génétique, il a été possible d'identifier plusieurs récepteurs permettant la perception de sucre. Gr5a fut le premier récepteur pour lequel une réponse au tréhalose a été montrée (Dahanukar *et al.* 2001; Ueno *et al.* 2001).

Dans les années suivantes, il a été démontré que d'autres récepteurs gustatifs répondaient exclusivement aux sucres. Gr64a-f, Gr61a et Gr43a font ainsi partie, avec Gr5a, de la super famille des récepteurs gustatifs aux sucres (Dahanukar *et al.* 2007; Jiao *et al.* 2007; Slone *et al.* 2007).

### ii. Les récepteurs à l'amer

Tout comme pour les récepteurs aux sucres, de nombreux récepteurs répondant à l'amer ont été identifiés et peuvent être coexprimés avec des gènes tels que Gr33a, Gr66a et Gr93a (Thorne *et al.* 2004; Moon *et al.* 2006; Weiss *et al.* 2011).

Une classification précise de la localisation des GR répondant à différentes molécules aversives a été établie par Weiss Weiss *et al.* (2011). De ce travail découle l'observation de plusieurs sous-groupes de sensilles qui se comportent plus ou moins spécifiquement en fonction du stimulus amer qui leur a été présenté en électrophysiologie (**Figure 6**). Cinq Gr ubiquitaires dans les sensilles activées par l'amer forment les unités de base de la perception de ce goût, ce sont : Gr32a, Gr33a, Gr39a. a, Gr66a et Gr93a.

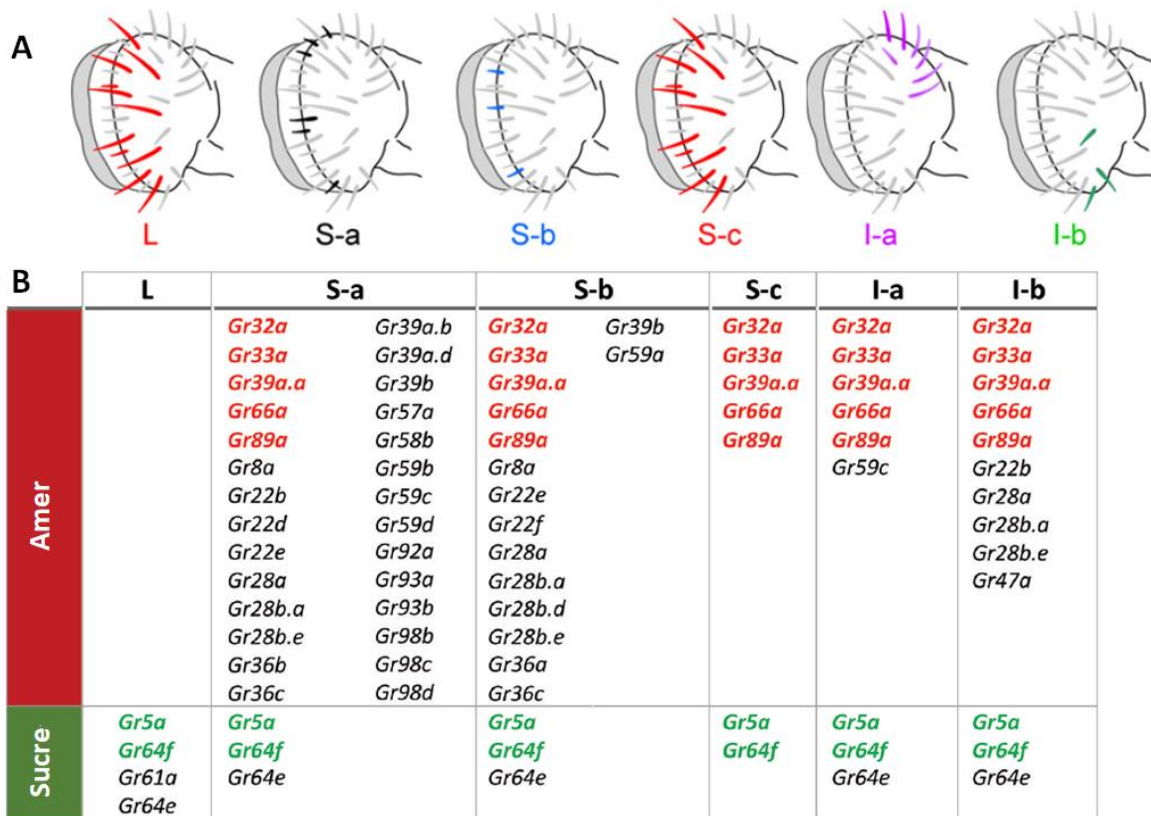


Figure 6 : Liste des gènes de GR exprimés dans les sensilles gustatives du proboscis

(A) – Localisation des différents types de sensilles gustatives répondant à l’amer et/ou au sucre. (B) – Liste des gènes de récepteurs gustatifs exprimés dans les différentes sensilles. Adapté de Weiss et al., 2011 et French et al., 2015.

Comme pour les sucres, quelques GR ont été reliés directement à une molécule les activant spécifiquement par des expérimentations comportementales et électrophysiologiques chez *Drosophila melanogaster*. Cette identification est le résultat d’excision d’un gène d’intérêt ce qui entraîne une insensibilité de la lignée mutante au composé proposé (Moon *et al.* 2006). La caféine active *Gr33a*, *Gr66a* et *Gr93a* et il a été montré grâce à une combinaison d’approches génétiques, que ces trois récepteurs sont nécessaires à la détection pour cette molécule et sont donc probablement des co-récepteurs (Moon *et al.* 2006; Lee *et al.* 2009; Moon *et al.* 2009).

### iii. Suppression de la modalité sucrée par les molécules aversives

Les composés aversifs comme la caféine ou encore la strychnine sont bien détectés par les drosophiles et induisent un comportement de répulsion que l’on observe grâce à l’arrêt

de la prise alimentaire (en comportement) ainsi qu'une activation des neurones sensibles à l'amer. Toutefois, il a été démontré que les molécules aversives ne faisaient pas qu'activer les récepteurs à l'amer, mais elles inhibent aussi les récepteurs aux sucres (Meunier *et al.* 2003; French *et al.* 2015).

En effet, il est nécessaire qu'un animal puisse analyser la complexité de la source de nourriture sur laquelle il est en train de consommer pour ne pas s'intoxiquer. Bien que la drosophile soit équipée de récepteurs gustatifs répondant à divers composés ayant des sensations gustatives diamétralement opposées, lorsqu'elle est en présence d'un mélange, la détection peut être compliquée.

#### d. PLASTICITE DU SYSTEME GUSTATIF AVERSIF

Comme pour la plupart des systèmes sensoriels, les informations délivrées par le système gustatif n'impliquent pas une réponse stéréotypée de l'animal mais ces réponses varient en fonction de son état physiologique ou de son histoire (mémoire). Ainsi, l'état de satiété module très largement la réponse aux substances appétitives et aux substances amères. Chez les insectes phytophages, il semble que les récepteurs eux-mêmes puissent changer de sensibilité en fonction de l'expérience.

Plusieurs études ont permis de montrer un comportement d'évitement lors de la présence d'une molécule amères sur le substrat nutritif (Glendinning *et al.* 2001a; Meunier *et al.* 2003). Chez le sphinx du tabac, les sensilles gustatives des larves répondent à différentes catégories chimiques correspondant à des substances amères comme les alcaloïdes (quinine, caféine, nicotine, etc...), les pyridines (paraquat) ou encore les saponines (escine) qui mettent à l'épreuve la polyvalence et la plasticité du système gustatif.

Toutefois, Glendinning a montré que le sphinx du tabac peut s'adapter suite à une exposition à la caféine (Glendinning *et al.* 1999). Suite à une exposition de 48h à une forte concentration de caféine, les cellules qui y étaient sensibles sont désensibilisées. De plus, après le traitement, lorsqu'ils sont stimulés avec de la salicine, les insectes ne semblent pas non plus réagir à la présence de salicine, mais l'acide aristolochique est quant à lui détecté. Glendinning déduit de ces observations que la caféine et la salicine partagent la même voie de transduction qui est désensibilisée, mais que l'acide aristolochique active une autre voie de transduction. Ces

résultats suggèrent que l'adaptation d'un insecte phytophage à une plante produisant des composés amers impliquerait une modulation de la sensibilité périphérique (indépendante de la détoxification) et que cette perte de sensibilité ne concernerait pas toutes les substances amères.

### 3. APPROCHES EXPERIMENTALES ET QUESTIONS

#### a. MESURE DE LA CONSOMMATION

##### i. Comment les insectes réagissent-ils à la détection de composés amers ?

Contrairement aux vertébrés, les insectes ne peuvent pas exprimer par des mouvements faciaux la perception d'une substance désagréable pour eux. La seule façon que les scientifiques ont trouvé pour évaluer l'amertume chez les insectes est par la consommation. En effet, nous savons déjà que chez les Hommes, un goût amer peut entraîner une diminution de la prise de la nourriture en question.

Bien que plusieurs tests permettant d'observer la consommation des insectes existent, le principe reste le même à chaque fois. On donne à des individus le choix entre une solution appétante, comme du saccharose ou du fructose, et une autre solution amère mélangée au même sucre que le contrôle et on regarde laquelle ils préfèrent (tests de choix). Ou alors, un groupe d'individu consommera la solution appétante et un autre groupe consommera la solution amère et on mesurera s'il y a une baisse de la consommation pour la solution qui est censée être amère (tests en situation de non-choix). Plusieurs systèmes existent pour les insectes et certains ont déjà été testés sur *Drosophila melanogaster*.

##### ii. Est-ce que la réduction de l'alimentation est toujours égale à amertume ?

Toutefois, même si la plupart du temps l'amertume est équivalente à une baisse de la consommation, il peut y avoir des paramètres qui faussent l'interprétation. En effet, des effets post-ingestifs qui induisent un malaise peuvent limiter la consommation très rapidement après l'ingestion mais ça ne signifie pas pour autant que la solution est amère (Wrubel and Bernays 1990a; Ayestaran *et al.* 2010).

De plus, lorsque nous prenons simplement la consommation moyenne d'un groupe d'individus ayant été soumis au même test, un effet collectif peut masquer des différences inter-individuelles qui sont présentes. Comme chez les vertébrés, tous les individus n'ont pas le même seuil de tolérance à l'amertume (Whitney *et al.* 1990).

### **iii. Systèmes d'évaluation de la consommation chez les insectes**

Les systèmes les plus répandus chez *Drosophila melanogaster* sont, le marquage de l'abdomen par coloration (Tanimura *et al.* 1982) ou par des isotopes radioactifs (Geer *et al.* 1970), les tests d'extension du proboscis (PER) et les tests de consommation par capillaires (CAFE) (Ja *et al.* 2007). Le marquage radioactif et le CAFE sont des tests quantitatifs, à l'inverse de la coloration et du PER. Toutefois, le marquage radioactif nécessite de sacrifier les drosophiles pour pouvoir déterminer la consommation réelle, ce qui n'est pas le cas des trois autres méthodes. Enfin, les techniques de marquages sont réalisées sur un temps court, car après 30 minutes, la nourriture est excrétée (Deshpande *et al.* 2014).

Le test par marquage bleu/rouge est le test de consommation le plus utilisé. Le principe en est simple : un groupe de drosophiles a accès à une plaque avec des puits remplis d'agar mélangé soit à 1 mM de sucre (additionné à un colorant alimentaire rouge) soit à 5 mM de sucre + le composé amer que l'on souhaite tester (mélangé à un colorant alimentaire bleu) (Tanimura *et al.* 1982). Les drosophiles sont placées à l'obscurité et libres de se nourrir pendant un temps donné (environ 2 h) et à la fin de ce temps, on regarde la couleur de leur abdomen pour déterminer qualitativement ce qu'elles ont consommé. Comme ce qui est mesuré généralement est la proportion de mouches avec un abdomen coloré, la précision du test est dépendante de l'observateur et surtout, la mesure obtenue n'est pas quantitative.

Quand je suis arrivée au laboratoire, une version modifiée du test CAFE était déjà utilisée mais quelques inconvénients étaient présents, il n'était pas automatisé et l'évaporation était très importante. Nous avons amélioré le système afin d'en concevoir un appelé le multiCAFE car plusieurs drosophiles sont testées individuellement et de façon précise. Notre système est maintenant automatisé pour la prise de photos à intervalles réguliers, ainsi que pour l'analyse des données. Pour chaque expérience nous obtenons la consommation réelle (sans

évaporation) de chaque drosophile pour les deux capillaires auxquels chacune a accès, que ce soit pour un temps court, de quelques heures, ou long, sur plusieurs jours (**Figure 8**).

Ce système est une grande amélioration sur les précédents car il nous permet d'observer plusieurs modalités, la consommation réelle et la survie, sur des individus uniques et sur des temps variables. Avec les tests classiques bleu/rouge, les résultats peuvent être biaisés à cause de l'excrétion et donc de la perte de couleur de l'abdomen. De plus, un abdomen rouge ou bleu ne nous dit pas précisément en quelles quantités les solutions ont été ingérées.

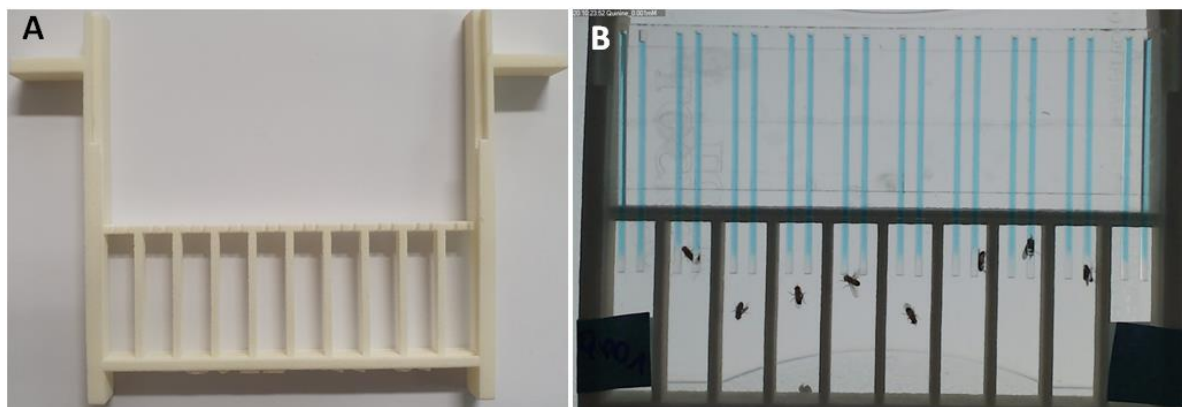


Figure 7 : MultiCAFE développé au laboratoire

(A) – Photo d'un portoir vierge. (B) – Photo de la mise en place standard d'un portoir avec des drosophiles de 3j au début d'une expérience

En utilisant le multiCAFE, j'espère obtenir un moyen de distinguer les effets de l'amertume et de la toxicité en suivant la consommation et la survie des drosophiles. Bernays a déjà testé quelques méthodes chez *Schistocerca gregaria* pour séparer les effets chimiosensoriels des effets physiologiques (Szentesi and Bernays 1984; Usher *et al.* 1989). Ces approches sont difficiles à appliquer à la drosophile : leur petite taille ne permet pas d'envisager pour l'instant de mettre en place une canule et la taille des particules utilisées par Usher *et al.* (1989) est trop grosse pour nos insectes.

## b. STRATEGIES DE MASQUAGE DU GOUT AMER DANS LES DOMAINES ALIMENTAIRE ET PHARMACEUTIQUE

Dans la littérature, deux types de masquages de l'amertume de certaines molécules sont décrits. Le goût amer peut être masqué par l'ajout d'une ou plusieurs autres molécules de goûts différents pour former une solution où il y aura des interactions entre ces goûts. C'est un masquage organoleptique. L'autre méthode est un masquage physique par effet d'encapsulation/complexation de la molécule amère avec des composés naturels ou de synthèse.

### i. Masquage par ajout d'autres molécules gustatives

Chez l'homme, quatre goûts primaires sont généralement caractérisés comme pouvant avoir des interactions entre eux, le sucré, l'acide, le salé et l'amer. Nous allons nous focaliser sur les interactions entre le goût amer et les trois autres goûts de base.

Les composés sucrés sont définis comme ayant le plus haut potentiel de masquage du goût amer et c'est pourquoi se sont les molécules préférentiellement utilisées lors des études. En effet, en plus de la réduction du goût amer, ce sont des composés qui sont généralement attractifs pour les êtres vivants ce qui permet de stimuler la consommation des solutions d'intérêt. Le saccharose est un sucre très utilisé avec des composés amers. C'est un bon inhibiteur d'amertume (Beck *et al.* 2014; Mennella *et al.* 2015) tout comme le sorbitol ou le mannitol qui ont un effet inhibiteur sur des molécules telles que la caféine, la quinine ou le benzoate de dénatonium (Kamen *et al.* 1961; Calvino *et al.* 1990; Schiffman *et al.* 1994). Toutefois, cette diminution de l'amertume est corrélée avec l'intensité des solutions utilisées. En effet, à des intensités faibles, le sucre est très efficace, par contre lorsque les deux goûts sont à des intensités fortes, il y a une inhibition mutuelle des goûts (Keast and Breslin 2002).

De la même manière, les sels, comme le chlorure de sodium (NaCl), ont un fort pouvoir d'inhibition du goût amer (Frijters and Schifferstein 1994; Breslin and Beauchamp 1995; 1997). Dans son étude, Kroeze a montré que la suppression du goût amer par NaCl dépend de la région de la langue où la solution est placée, ce qui reflète des voies neuronales différentes (Kroeze and Bartoshuk 1985). Toutefois, l'inhibition de l'amer par des composés au goût salé

dépend du sel utilisé mais aussi du composé amer. En effet, l'amertume du trétralone n'est jamais diminuée quelle que soit la combinaison en solution avec différents sels (Keast *et al.* 2004).

Enfin, la relation entre les composés amers et les composés acides n'est pas consensuelle dans la littérature. En effet, leur relation est complexe car les acides peuvent augmenter mais aussi diminuer l'amertume. Mais l'inverse peut aussi survenir avec des molécules amères qui affectent le goût acide (Kamen *et al.* 1961; Breslin 1996; Keast and Breslin 2002). Wilkie suggère dans sa revue (Wilkie and Phillips 2014) que cette dualité est sûrement due à un problème d'identification du goût et non de sa perception car dans une autre étude, dans un tiers des cas, les personnes ont qualifié l'acide citrique d'amer, alors qu'ils sont capables de sentir la différence entre l'acide citrique et la quinine (Cruickshanks *et al.* 2009). Wilkie propose aussi plusieurs moyens pour essayer de pallier ce problème mais la probabilité que cela fonctionne ne paraît pas bonne car les interactions sont trop instables entre l'acidité et l'amertume.

Chez les insectes, des interactions similaires peuvent exister mais ont été moins étudiées. Hormis les études de Bernays déjà citées, à notre connaissance un seul autre article aborde le masquage de l'amertume par les sucres chez *Manduca sexta* (Cocco and Glendinning 2012), phénomène qui a également été abordé au cours de sa thèse par (Ali Agha 2016). Bien que les sucres soient généralement considérés comme ayant la même activité chez l'homme et chez la drosophile (Gordesky-Gold *et al.* 2008), ce n'est pas le cas pour toutes les molécules comme le sorbitol, par exemple, qui est nutritif mais non détecté par le système gustatif des drosophiles (Rohwedder *et al.* 2012).

## **ii. Masquage par méthodes physiques**

Quatre grandes techniques de masquage physique de l'amertume apparaissent dans la littérature :

- **La complexation avec des cyclodextrines**

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides hydrosolubles cycliques dérivés de l'amidon. Il existe 3 types de cyclodextrines,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , qui sont distinctes par le nombre de structures en formes d'anneaux qu'elles forment (respectivement 6 à 8) (Martin Del Valle 2004). Les



cyclodextrines possèdent une structure conique effilée avec une face interne hydrophobe et une face externe hydrophile, ce qui permet, en une solution, à des petites molécules hydrophobes d'interagir avec les cyclodextrines et de former un complexe thermodynamiquement stable (Brewster and Loftsson 2007). Ainsi, le masquage de l'amertume interviendrait lorsque la partie de la molécule amère est incluse dans la structure conique des cyclodextrines. La  $\beta$ -cyclodextrine est la plus utilisée des trois et il a été remarqué qu'elle pouvait réduire de moitié le goût amer de la naringine et du limonène à une concentration seulement 0,5% (Konno *et al.* 1982). Par contre, le masquage n'est pas toujours efficace car la caféine n'a pas l'air d'avoir son amertume influencée par interaction avec la  $\beta$ -cyclodextrine (Gaudette and Pickering 2012).

- **Les interactions avec des polymères naturels ou de synthèse**

Les polymères peuvent être d'origines naturelle (végétale, animale ou microbienne), comme les protéines ou les polysaccharides, ou de synthèse. Ils ont la capacité de lier de petites molécules. Les protéines possèdent dans leur structure primaire des domaines hydrophobes pouvant lier des molécules hydrophobes. Elles possèdent également des domaines hydrophiles, les rendant ainsi amphiphiles et leur octroyant des propriétés interfaciales intéressantes. Les conformations tertiaires et quaternaires des protéines dépendent des facteurs physico-chimiques et physiques environnementaux (Coupland and Hayes 2014). Les polysaccharides quant à eux ont une structure primaire hétérogène et leur conformation varie entre une structure hélicoïdale et une structure spirale désordonnée. Ils sont généralement utilisés dans des solutions aqueuses pour les rendre plus visqueuses ou pour former des gels. Les polymères peuvent se lier à de petites molécules via des interactions non covalentes. Des molécules hydrophobes peuvent ainsi se lier aux domaines hydrophobes des protéines ou d'un copolymère synthétique ou des hélices de polysaccharides (tels que l'amylose). Les molécules polaires peuvent quant à elles interagir avec les domaines hydrophiles des polymères par liaisons hydrogène ou par des interactions électrostatiques (Coupland and Hayes 2014). Toutefois, leur efficacité sur des composés amers peut être minime (Pripp *et al.* 2004) ou assez efficace (Molina Ortiz *et al.* 2009; Hoang Thi *et al.* 2012).

- **Les microémulsions et les tensioactifs**

Les tensioactifs sont des petites molécules possédant à la fois une tête hydrophile et une chaîne hydrocarbonée hydrophobe, toutes deux de compositions et longueurs variables selon le type de tensioactif. De par leur caractère amphiphile, ils ont ainsi la capacité de se mettre aux interfaces lipophiles et/ou hydrophiles. Ils sont utilisés pour stabiliser des dispersions, comme agents de mouillage ou pour solubiliser des molécules lipophiles. Les lipoprotéines, complexes protéines et lipides (tels que les phospholipides), ont des propriétés, sont utilisées pour leur propriété tensioactive très intéressante. Elles supprimeraient plus ou moins efficacement l'amertume d'un large éventail de stimuli, à priori en se liant directement aux membranes cellulaires gustatives (Katsuragi, Yasumasu et al. 1996), particulièrement l'acide phosphatidique abaisserait l'amertume de la quinine, de la berbérine ou de la brucine et dans une moindre mesure la thiamine et la strychnine (Katsuragi *et al.* 1996; Katsuragi *et al.* 1997).

Les tensioactifs ont la capacité de s'autoassembler au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC) pour former des microémulsions. Ces structures auto-assemblées peuvent également s'associer à différentes molécules.

- **Les émulsions et les lipides**

Un grand nombre de molécules amères sont hydrophobes. Ainsi, si elles sont très faiblement solubles dans l'eau, leur amertume serait moins perçue. La partition d'une molécule entre une phase lipidique et une phase aqueuse est donc un facteur important dans la perception du goût amer. La suppression de l'amertume par la solubilisation des molécules amères dans une phase lipidique n'est pas universelle et dépend des propriétés de la molécule considérée. Par exemple, la matière grasse contenue dans le lait a eu un effet significatif pour supprimer l'amertume et l'astringence de l'extrait phénolique de *A. saturoioides* (Ares *et al.* 2009). Cependant, le seuil du goût amer de la caféine était augmenté en présence de 1% d'acide linoléique (Mattes 2007) ou lorsque le café était solubilisé dans le lait entier *versus* le lait écrémé (Keast 2008). La caféine étant une molécule hydrophile, l'augmentation de son amertume dans le lait pourrait être due aux fortes interactions entre la caféine et les protéines du lait, ce qui pourrait atténuer tout effet de la phase lipidique.

### C. OBJECTIFS ET DEMARCHE

Les objectifs de ma thèse étaient de mettre en évidence l'existence d'un lien entre la toxicité et l'amertume de certaines molécules chez *Drosophila melanogaster*. Pour ce faire, nous avons choisi un panel de 7 molécules connues pour être amères chez l'homme et chez certains insectes. Ce sont des molécules naturelles ou de synthèse qui appartiennent à plusieurs familles chimiques. La caféine, la nicotine, la quinine et la berbérine sont des alcaloïdes, l'escine est une saponine, le paraquat est une pyridine et le benzoate de dénatonium est un sel benzoïque (**Figure 8**). Grâce à ce panel, nous couvrons donc un ensemble de structures chimiques variées.

Pour évaluer l'aversion et la toxicité, nous avons mesuré la consommation individuelle de drosophiles. En effet, dans la littérature, la toxicité est généralement évaluée par ingestion en ajoutant le composé d'intérêt au milieu nutritif. Mais grâce à notre nouveau dispositif automatisé de multiCAFE, nous allons pouvoir être plus précis.

Le **Chapitre 1** de ma thèse décrit tout d'abord notre dispositif de test de consommation qui a été adapté de modèles précédents, l'équipe de Ja en étant à l'origine (Ja *et al.* 2007). Les plugins développés au laboratoire pour une automatisation de l'analyse sont aussi décrits. Dans ce chapitre, je m'intéresse à des tests de courte durée, en évaluant la préférence de consommations de 7 substances (citées précédemment) chez *Drosophila melanogaster*. Je démontre dans ce chapitre que la consommation des drosophiles se partage en 2 profils synonymes de 2 méthodes de détection.

Le test de consommation que nous avons mis en place est beaucoup plus précis que les expériences de choix classiques où la préférence est observée par coloration de l'abdomen. En effet, lorsque les drosophiles consomment peu, l'approche par colorimétrie peut donner lieu à une mauvaise interprétation. Notre approche est aussi très intéressante car c'est la première fois que l'on peut observer la modulation précise et individuelle de la consommation des insectes.

Nous avons aussi observé lorsque nous avons testé un mutant gustatif pour la détection de la caféine (Gr66a), que les mouches perdaient effectivement la capacité de détecter la caféine, mais pas chez des mouches contrôle (portant la mutation *white*).

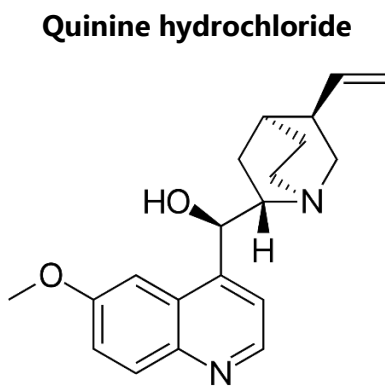
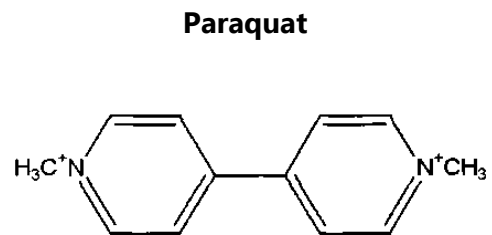
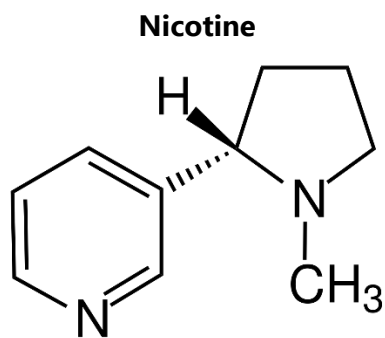
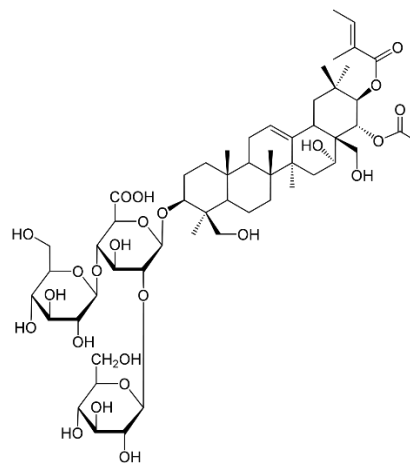
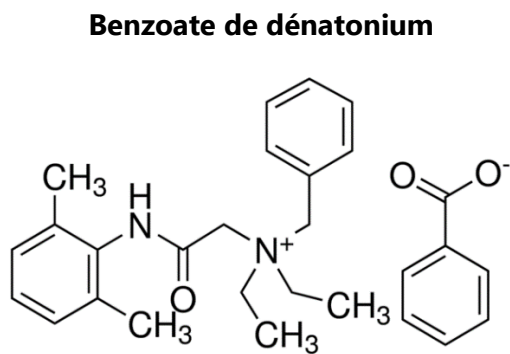
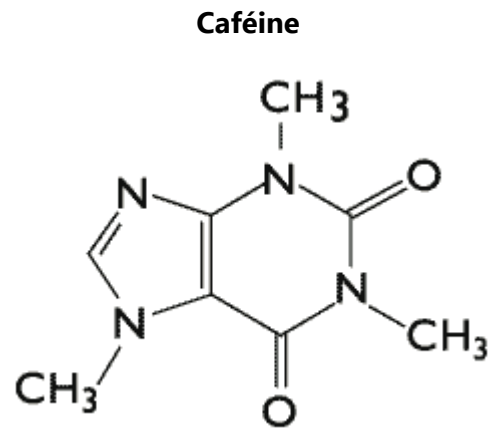
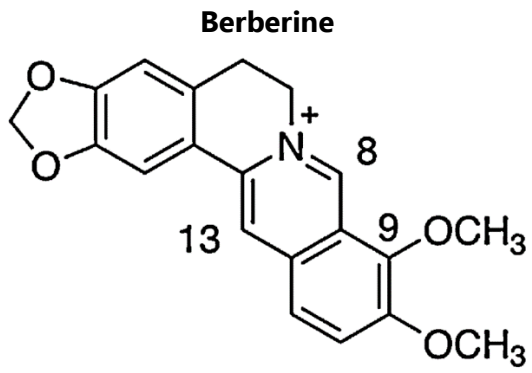


Figure 8 : Structures chimiques des molécules testées

Dans le **Chapitre 2**, nous testons ces 7 substances de plusieurs façons pour voir s'il y a un lien entre leur amertume et leur toxicité. S'il existe un lien direct entre l'amertume et la toxicité, une molécule amère doit être toxique, et plus la molécule est toxique plus elle doit être perçue comme amère. Ce chapitre sera présenté également sous forme d'article en vue d'une publication.

Le premier test est un test de toxicité par ingestion dans un milieu solide, une approche traditionnelle. Puis, un deuxième test de toxicité par injection dans l'abdomen, ce qui permet de dissocier amertume et toxicité par rapport au test précédent. Enfin, nous utilisons une nouvelle fois le multiCAFE mais cette fois-ci pour des expériences longues, entre 8 et 14 jours pour relier la consommation réelle à la toxicité. Cette mesure sur le long terme est une grande nouveauté car on peut voir l'adaptation des drosophiles vis-à-vis de la source de nourriture.

Nous avons observé que la concentration létale 50 (CL50), c'est-à-dire la concentration nécessaire pour que 50 % des drosophiles meurent au bout de 3 jours, est différente en fonction des trois expériences réalisées. Nous nous basons sur ce paramètre pour évaluer de la même façon la toxicité des molécules lors des différentes expériences. De plus, nous avons observé que les drosophiles consommaient de la même manière quelle que soit la concentration d'amer, sauf à la plus haute concentration. Elles ne semblent pas moduler leur ingestion de quantité de molécules toxiques, mais plutôt de viser une quantité cible de sucre.

Enfin, une molécule peut être très toxique par injection mais pas nécessairement lors du multiCAFE, c'est le cas du paraquat. Certaines de nos molécules valident les critères de l'hypothèse de départ, comme la berbérine, la quinine ou la caféine, mais ce n'est pas le cas pour toutes. Ces résultats ne sont pas concluants pour prouver l'existence d'un lien direct entre toxicité et amertume. Cependant, il est encore difficile de dissocier correctement la toxicité de l'amertume lors de test de consommation.

Dans le **Chapitre 3**, je me suis intéressée aux étapes préalables de formulation dans le but de masquer une molécule amère et son goût répulsif. Pour ces tests, nous avons choisi l'oleuropéine qui est un des composés amers majoritaires de l'huile d'olive. Je vais tout d'abord tester son potentiel amer avec le multiCAFE, puis dans un second temps, je vais étudier le potentiel d'une protéine globulaire laitière, la  $\beta$ -lactoglobuline, à masquer le goût amer de l'oleuropéine par interaction/complexation. En effet, la  $\beta$ -lactoglobuline a montré une affinité

pour une large gamme de molécules telles que les acides gras, les vitamines et les polyphénols. Il a été également montré que des molécules amères telles que la caféine et la quinine établissent des interactions avec cette protéine et que leur amertume semble avoir été plus ou moins atténuée. Ces résultats seront, eux aussi, présentés sous forme d'article.



# Chapitre 1





# CHAPITRE 1 : CHOIX ALIMENTAIRE A COURT TERME

---

Lors de la première partie de ma thèse, je me suis concentrée sur l'étude de la perception à court terme de molécules connues pour être amères pour l'homme et qui sont souvent étudiées chez *Drosophila melanogaster*.

Les systèmes gustatif et olfactif chez les insectes leur permettent de collecter et de transmettre les informations concernant l'environnement dans lequel ils se trouvent. La perception du goût amer est un signal d'alarme signalant la présence de molécules toxiques dans la source de nourriture ou sur le site d'oviposition.

Afin d'aller plus loin dans l'étude de la détection de ces molécules amères par la drosophile, j'ai réalisé des tests de choix de consommation en mesurant la quantité réelle ingérée. Ces tests ont permis de montrer deux profils de consommation qui laisse penser à deux mécanismes distincts de perception des molécules.

Cette étude va être soumise très prochainement à la publication et j'en serai le premier auteur.

# Two strategies to avoid toxins: avoidance or limiting overall consumption

Authors: Perrine Colombi<sup>a</sup>, Béatrice Denis<sup>a</sup>, Frédéric Marion-Poll<sup>a, b</sup>

Addresses: (a) UMR Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie, CNRS-IRD-Univ. Paris-Saclay, Université Paris Saclay, Campus CNRS, Bâtiment 13, BPI – 91198 Gif-sur-Yvette – France

(b) AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris – France

## Summary

Like all other animals, *Drosophila* adult flies are equipped with a gustatory system detecting bitter molecules, which allow them to avoid ingesting potentially toxic molecules. A popular experimental paradigm is to give flies a choice between bitter and safe food, and to monitor if flies show a dose-dependent avoidance from the bitter source. But if they feed less from the bitter food, do they compensate by feeding more from the “safe” source? We tested this assumption using a panel of 7 bitter / noxious molecules. With quinine, berberine and denatonium, flies avoided the bitter solution and correspondingly increased their feeding from the other solution. With escin and nicotine however, we observed a dose-dependent reduction of feeding from both solutions. With caffeine and paraquat, we observed intermediary situations between a dose-dependent feeding compensation and a dose-dependent feeding reduction. This feeding reduction might be directly related to a post-ingestive detection and to a poor sensory discrimination at the periphery. In order to test if poor sensory discrimination changes the type of reaction, we used *Gr66a* mutant flies, which are impaired in the detection of caffeine. As expected, *Gr66a<sup>ex83</sup>* mutants reduced their overall feeding, while Canton S flies could clearly choose the non-treated food source at all concentrations. This result is supportive of a prevalent role of post-ingestive processing when sensory information is not clear. All in all, these observations indicate that both the ratio and the total quantity of food ingested are informative, as feeding choices are the combined result of pre-ingestive and post-ingestive evaluation by the flies.

## 1. INTRODUCTION

The behavioral responses to compounds that humans characterize as bitter consists of immediate aversive reactions that range from feeding cessation to aversive reflexes (*e.g.*, tongue retraction, gaping, increased latency to swallow, lowered heart rate, and nausea) or even vomiting (Davis *et al.* 1986). Similar aversive reflexes can be observed in neonate vertebrates suggesting it constitutes an innate response trait (Ganchrow *et al.* 1983). Such aversive reactions are also documented in insects as different as cockroaches (Wada-Katsumata *et al.* 2013), flies (Dethier 1976), lepidopteran adults (Minnich 1921) and larvae (Glendinning 1994). Hence, chemicals which induce immediate food rejection are usually called "bitter".

Rejection of food containing bitter molecules is adaptive since it contributes to prevent animals from ingesting potentially noxious compounds. Usually, specialist animals show a low behavioral and sensory threshold for bitter molecules (Bernays and Chapman 2000; Bernays *et al.* 2000). Generalists species, which are potentially exposed to diverse sources of food, as they have a high tolerance to bitter chemicals (Jacobs *et al.* 1978). It is commonly believed that food rejection is related to the expression of dedicated taste receptors in sensory cells, which, when activated, drive the rejection behavior. Interestingly, while specialist species have a high sensitivity to bitter chemicals, they are equipped with less gustatory receptors (Li and Zhang 2014). This is true for carnivorous species that have lost their sugar receptors (Li *et al.* 2005; Beauchamp and Jiang 2015), and for blood feeders, like vampire bats, which have lost some of their bitter receptors (Zhao *et al.* 2010; Hong and Zhao 2014). Specialist insects like *Pediculus humanus* have only 6 taste receptors (Kirkness *et al.* 2010). On the contrary, herbivores and generalist animals show an expanded repertoire of chemoreceptors. *Drosophila* generalist species possess more chemosensory receptors than specialist species (McBride 2007; McBride and Arguello 2007). A large expansion of bitter receptors is found in herbivorous insects (180 to 230) (Xu *et al.* 2016; Gouin *et al.* 2017) and even more in an omnivorous insect like *Blattella germanica* (431 receptor genes encoding 483 proteins) (Robertson *et al.* 2018).

Finding which ligands activate these receptors is still an ongoing task. For example, *Gr66a* was identified in *D. melanogaster* as necessary to the detection of caffeine by screening a bank of mutants defective in their feeding behavior (Thorne *et al.* 2004; Moon *et al.* 2006). Since

rescuing this gene restored the avoidance, it allowed to infer this gene is involved in the detection of caffeine. The current view is that GRs are actually functioning as multimeric receptors (Lee *et al.* 2009; Moon *et al.* 2009; Shim *et al.* 2015). *Gr66a* and a few other Grs, being necessary for the detection of many other bitter substances, were therefore dubbed “core receptors” (Moon *et al.* 2006; Moon *et al.* 2009; Weiss *et al.* 2011; Lee *et al.* 2015). However, we are still not completely understanding the logic of association between GRs since removing or adding a GR from a gustatory neuron may as well give a neuron the capability to detect a new molecule or to fail to detect previously detected molecules (Weiss *et al.* 2011; Delventhal and Carlson 2016; Sung *et al.* 2017).

Taste receptors might not be the only way for animal to detect bitter and potentially toxic compounds. Sparse observations indicate that insects can learn to avoid food or an odor stimulus associated with a post-ingestive malaise (Lee and Bernays 1990; Behmer *et al.* 1999; Wright *et al.* 2010; Simoes *et al.* 2012; Lai *et al.* 2020). Post-ingestive effects might not need to imply specialized circuitries as they can affect the whole metabolism and general metabolic and respiratory parameters (Muñoz *et al.* 2020). Furthermore, these effects might be very quick. One study in particular (Glendinning 1996) indicates that *Manduca sexta* larvae possess internal sensors to nicotine inducing an aversive responses within 30 s or less, while no detectable sensory input was detected at the periphery.

Is it possible to dissociate the impact of these two mechanisms on the feeding behavior of animals given a choice between treated and non-treated food sources? If pre-ingestive sensory mechanisms are prominent, we expect animals to be able to change the ratio of their feeding in relation with the concentration of the noxious/bitter compound. If sensory detection is defective or inoperant, but post-ingestive mechanisms are activated, we expect animals to reduce their overall consumption. Therefore, depending on how noxious molecules are sensed, we should find that when aversive molecules are well detected, the total quantity of food ingested should not change much, while when molecules are not well detected at the periphery but induce a post-ingestive effect, animals should reduce the total amount of food ingested.

Here, we tested these predictions on individual flies by measuring their capability to discriminate treated *versus* non-treated food, and monitored the absolute amount of food

consumed. As for bitter or noxious compounds, we selected molecules ranked by Weiss *et al.* (2011) : escin and denatonium, which were respectively the least and the most bitter compounds and caffeine and berberine, which were between these two extremes. To these molecules, we added quinine and nicotine. Quinine is often tested on animals because of its bitterness (Meunier *et al.* 2003; Sellier *et al.* 2011) and its negative impact on sugar detection (Kim *et al.* 2010; French *et al.* 2015). Nicotine is mostly known for its insecticide effects (Yildiz 2004), but it has also an aversive effect on feeding (Sellier *et al.* 2011) and a "bitter" taste for flies (Rimal and Lee 2019). We evaluated also paraquat, which is very toxic for flies (Hosamani and Muralidhara 2013), and reduces feeding when mixed with sugar (Ja *et al.* 2007).

By measuring how flies discriminate between two food sources as well as how much food they ingest during short term assays (2 h), we show here that chemicals that are well detected like quinine and denatonium are actively avoided. Chemicals which are not well detected like escin and nicotine induce a general feeding reduction as if flies were tested in no-choice conditions. In order to test the role of the sensory "discrimination", we tested the impact of caffeine toward flies impaired in its sensory detection, by using Gr66a<sup>ex83</sup> mutants (Moon *et al.* 2009). As expected, we found that mutant flies reduced their global feeding. Lastly, we evaluated the same chemicals in an imbalanced feeding test, whereby the solution containing the bitter substance is sweeter than the solution without it (Tanimura *et al.* 1982; Meunier *et al.* 2003). By comparing the ranking of these substances across the different methods of testing (choice, no-choice, imbalanced choice), we show that the order of effectiveness of these substances change, stressing the point that aversiveness involves different unrelated evaluation processes.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### **Drosophila stocks**

Flies were grown on David's axenic medium (David 1962) : 12g agar, 83g dried yeast (LCS Whole Yeast 50, Lesaffre Culinary Strasbourg, France), 83g roasted corn flour (farine de gaudes, Les graines du Père Pajo, France), 6.9g nipagin (VWR, France; CAS No. 99-76-3), 50 mL ethanol for 1L of water at 25°C, and 75% of relative humidity with a day:night cycle of 12:12. Emerged flies (~0-day old) were first sexed (after numbing them with CO<sub>2</sub>), then transferred to a freshly prepared axenic agar food medium for 3 days, and maintained in a rearing chamber at 25 °C.

In this work, we used the following *Drosophila melanogaster* strains: Canton S (Bloomington: BSC 64349), Gr66a<sup>ex83</sup> flies (Bloomington: BSC 42748; Moon et al., 2006), and *W1118* (Bloomington: BSC 3605).

## Chemicals

Most chemicals were from Sigma Aldrich of the highest available purity: sucrose (CAS No. 57-50-1, 99.5% purity), erioglucine (CAS No. 3844-45-9), berberine chloride ( $\geq 98\%$ ; CAS No. 633-65-8, escin ( $\geq 95\%$ ; CAS No. 6805-41-0), quinine hydrochloride ( $\geq 99\%$ ; CAS No. 6119-47-7), caffeine ( $\geq 99\%$ , CAS No. 58-08-2), nicotine hydrogen tartrate (98%; CAS no. 65-31-6) and paraquat dichloride hydrate (99.9%; CAS no. 75365-73-0). 5). Denatonium benzoate ( $\geq 99.9\%$ ; CAS: 3734-33-6) was from Fluka.

All solutions contained 30 mM sucrose and  $1.58 \times 10^{-2}$  mM of erioglucine mixed with ultrapure water, unless noted otherwise. The solutions were prepared no longer than a week in advance and kept at 4-6 °C.

## Capillary feeder test

All experiments were performed at 25 °C with 65%-70% R.H. in constant light. Flies were introduced into individual chambers and given *ad libitum* access to glass capillaries (5  $\mu$ l, 32 mm long; Hirschmann Laborgeräte, VWR, France) filled with different solutions just before the experiment. The test solutions were colored in blue with erioglucine in order to facilitate the semi-automatic detection of the liquid level. According to earlier tests, this dye has no effect on taste sensitivity and is not toxic for flies at the concentration used (Tanimura *et al.* 1982).

Each chamber (4 x 6 x 20 mm) had a transparent top and bottom, allowing to monitor the fly position as well as the level of liquid at the bottom of the capillaries inserted into the chamber. A 3D-printed holder (Nylon PA12, HD – 60  $\mu$ m, SLS Plastic; Sculpteo Pro, France) was designed to group 10 of such chambers (**Figure 9**), enclosed between 2 glass microscope slides (forming the top and bottom of each chamber). This holder also allowed to insert a third microscope glass slide on which 20 capillaries were disposed and secured with a strip of transparent double-sided sticky tape (**Figure 9B**). The capillaries were protruding into each cage by about 2 mm and were distant from each other by  $\sim 1$  mm. The left and right chambers were left without flies to monitor the evaporation rate of the capillaries during the experiment.

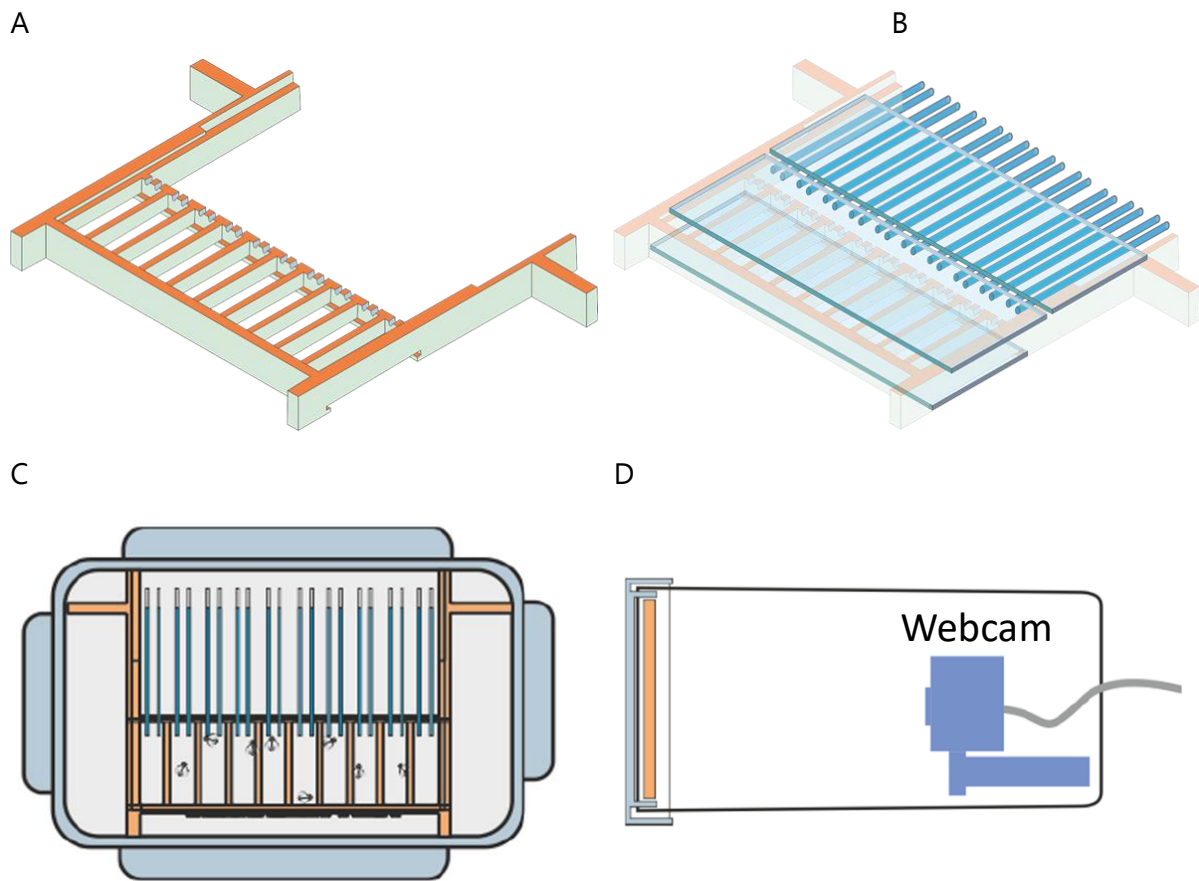


Figure 9 : MultiCAFE device

Schematic representation of the multiCAFE device developed in our lab. (A) is the 3D plastic frame and (B) how it is mounted before the flies are inserted. (C) How the frame is placed in the lid of the plastic container and its distance from the webcam.

Each holder was designed to fit inside of the cover of a semi-transparent plastic box (HPL809 1.3 l, Lock & Lock) (**Figure 9C**). A webcam (Logitech C920 HD Pro) was fitted at the bottom of the box, facing the cover. After clipping the cover with the chamber to top of the box, the box was placed in a climatic chamber, lying horizontally (**Figure 1D**), in front of a white LED A3 panel (Display Concept, Belgium) during the whole experiment. This experimental setting was adequate when using a climatic chamber regulating humidity at 70-80 % R.H. (DR-36VL, Plant Climatics, Germany). When using climatic chambers not regulating humidity, it was found useful to add a humidified paper into the box, lying down in front of the holder as well as a cup of water at the bottom of the chamber. Other approaches, such as topping each capillary with paraffin oil (Ja *et al.* 2007), were found difficult to use on a routine basis.



## Image Capture and Analyses

Each webcam was set to monitor capillaries and flies of one cage. At a resolution of 1280 x 720 pixels, each capillary (32 mm) was 300 to 400 pixels long and 5-8 pixels wide. The camera (Logitech HD Pro C920) was set to record 1 image per minute using a time-lapse capturing software (iSpy v 7.2.1.0; <http://iSpyConnect.com>). We could record simultaneously from 4 cameras on a regular PC computer under Windows 10, or from 16 cameras using 4 PCIe cards (PEXUSB3S44V, Startech).

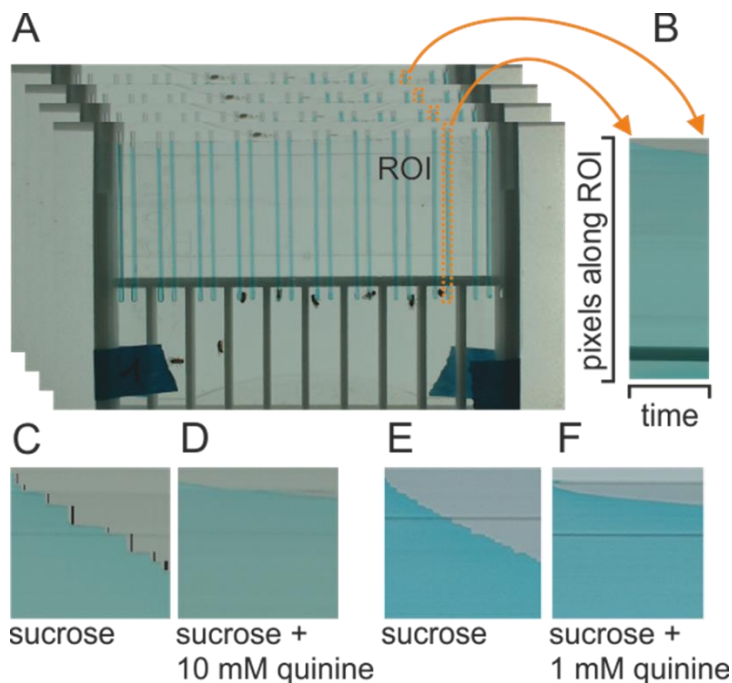


Figure 10 : Analysis of a multiCAFE experiment

(A) Stack of picture of an experiment with the multiCAFE device. One picture is equal to one point in time and when it is compiled it gives us a (B) kymograph where we can see the level of bleu liquid change. We observed two patterns of consumption, large sips follow by inactivity (C) or continuous small sips (E). D and F correspond to the evaporation in one empty cage of each box.

The resulting image stacks were analyzed to monitor changes of the liquid levels and the movements of the flies. We developed a custom program, multiCAFE (Marion-Poll 2020b), as a plugin running under the image analysis platform ICY (de Chaumont *et al.* 2012). In order to track the liquid level within each capillary, kymographs were generated from lines interactively placed over each capillary (**Figure 10A**). In the resulting kymograph, the x axis represents the time and the y axis the average value of a 2-3 pixels wide disk around each pixel along one

capillary (**Figure 10B**). Custom filters were designed to maximize the contrast between the background and the column of liquid, and the resulting grey images were thresholded to detect the top and bottom liquid levels within the capillaries (**Figure 10C-F**).

In some experiments, the bottom level of the liquid contained in the capillary went up, preventing the fly to further access the liquid in the capillary. In these cases, the capillary was removed from the analysis.

### **Preference index**

The level of the liquid of each capillary at instant  $t$  was subtracted by the value at  $t_0$  (the start of the experiment). It was corrected for evaporation by subtracting the average level of the corresponding solution of the two empty chambers of each holder.

The total consumption of each fly was obtained by adding the consumption from the 2 capillaries to which it had access:  $sum = (valL + valR)$ , with  $val$  standing for the corrected capillary level, and  $L$  standing for left and  $R$  for right capillaries respectively. In order to calculate a preference index (PI), we used the formula:  $PI = [(valL-valR)/sum]$ . If  $L =$  bitter and  $R =$  sucrose, a  $PI = 1$  corresponds to a consumption of the bitter solution only, while  $PI = -1$  corresponds to the consumption of sucrose solution.

These measures ( $sum$ ,  $PI$ ) were used to estimate the concentration of bitter substance that induces 50% of effectiveness (intermediary concentration 50:  $IC_{50}$ ).  $IC_{50}$  was estimated as follow:

For balanced choice tests, whereby sucrose was proposed at the same concentration in both capillaries, we estimated the  $IC_{50}$  of the consumption of the "bitter" capillary. The corresponding  $PI$  varies between 0 and -1, so the  $IC_{50}$  is defined as the concentration at which the dose-response curves crosses the value  $PI = -0.5$ .

For imbalanced choice tests, whereby sucrose on the treated side was proposed at 5 mM and at 1 mM on the untreated side, the  $PI$  can go from +1 to -1, so the  $IC_{50}$  is defined as the concentration at which the dose-response curve crosses  $PI = 0$ .

We also estimated the concentration of a bitter substance inducing a 50% reduction of consumption, in order to rank our bitter substances in no-choice conditions. This measure was also used in 2-choice assays, using the summated consumption (sum).

### **Statistical Analyses**

For most experiments, we tested 32 individuals. The measures (capillary levels, sum, PI) were exported to Excel spreadsheet files as rows, each row describing one temporal series, including textual descriptors pertaining to the experiment and the fly's identity, followed by the temporal series of measures. Data were statistically analyzed using R (version 4.0.4). For every experiment, we compared the mean consumption between treatments. We used either a Wilcoxon paired test or unpaired. The sample were paired if we compared the two capillaries that the flies had access to, or unpaired if we compared the total consumption.

## **3. RESULTS**

### **Flies make rapid and consistent choices over a two hours choice experiment**

We monitored the consumption of individual flies during 2 to 4 h with a time precision of 1 min. This time interval is not enough to track individual sips which can last only a few seconds (Itskov *et al.* 2014). However, flies feeding activities include two different patterns: large sips (**Figure 10C: black rectangles**) of 30 to 100 nL of liquid per minute, which are followed by a period of inactivity of several minutes or more, and fast successions of smaller sips whereby the insect stays on the capillary and feeds almost continuously (**Figure 10E**). Figures 2D, 2E show the corresponding evaporation in one empty cage of the box which is about 170-200 nL over 2 h, *i.e.* less than 1 nL / min.

The cumulated consumption of flies was found to be linear most of the time. What changed mostly with the experimental situation was the angle of these lines. As an example, we displayed the responses of flies to 3 concentrations of quinine, mixed with 30 mM sucrose (**Figure 11**). At the lowest concentration, flies do not readily discriminate the two capillaries and ingest about 0.2  $\mu$ L from each side in 2 h. At the highest dose, flies avoid feeding on 10

mM quinine mixed with 30 mM sucrose, and feed only on 30 mM sucrose. In the following, we summarized these time series by a single value, the consumption level after 2 h.

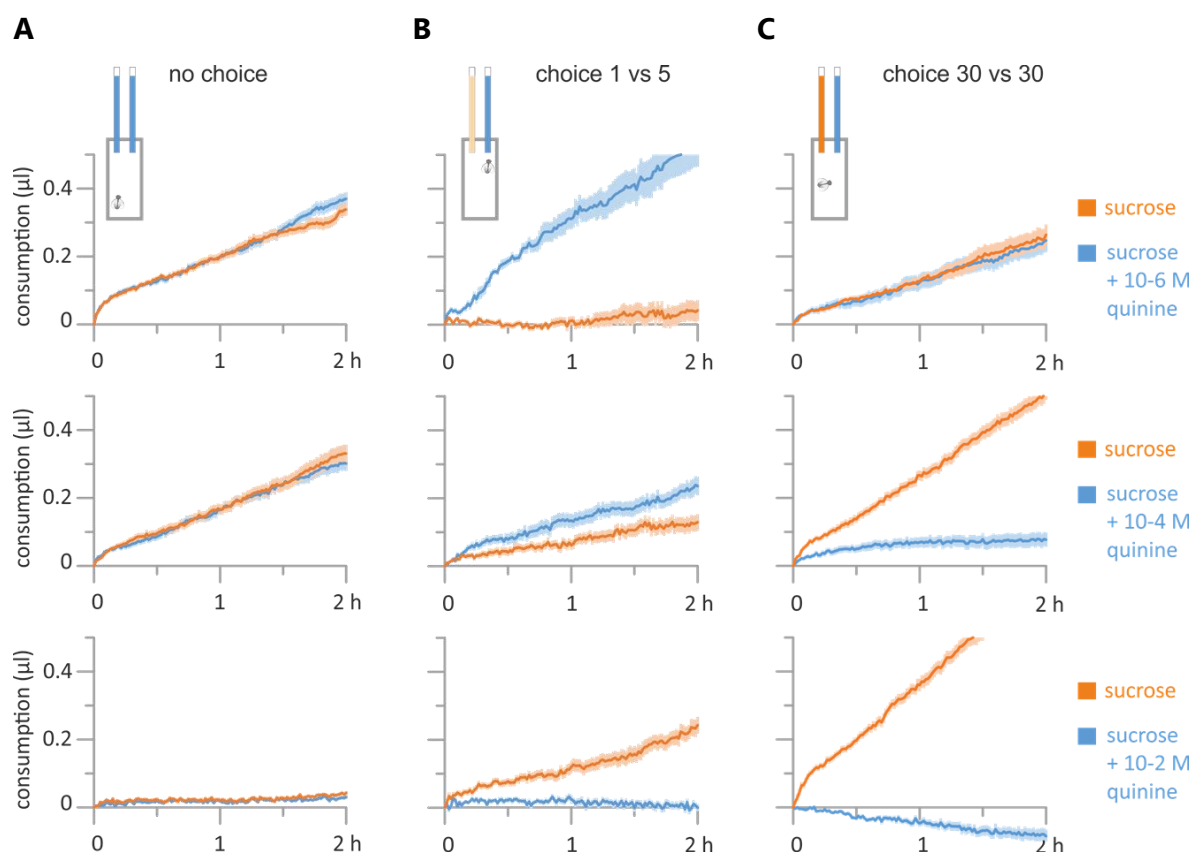


Figure 11 : Consumption time course of flies given access to 2 capillaries in a choice experiment

This is the representation of the average consumption of flies over a 2h experiment. (A) In the no choice experiment the flies have access to 2 capillaries filled with a solution of sucrose 30mM and quinine at different concentrations ( $10^{-6}$  M,  $10^{-4}$  M or  $10^{-2}$  M). We have two types of choice experiment, in the first one (B) flies have access to one capillary of sucrose 1mM (orange) and the other one of quinine concentrations ( $10^{-6}$  M,  $10^{-4}$  M or  $10^{-2}$  M) and sucrose 5mM (blue). In the other choice experiment (C) flies have access to one capillary of sucrose 30mM (orange) and the other one of quinine concentrations ( $10^{-6}$  M,  $10^{-4}$  M or  $10^{-2}$  M) and sucrose 30mM (blue).

As for the absolute consumption values measured here, we repeatedly observed that evaporation is higher in cages without flies than when flies are present. As a consequence, the corrected liquid level in capillaries where flies do not feed appears negative as with 10 mM quinine (**Figure 11C**). This also means that the values displayed on these graphs underestimate the quantities consumed. The variability around the average value is quite constant across the 2 h period, suggesting that flies make up their mind quite rapidly, within the first few minutes of being introduced in the cage.

## After a short-time choice between sucrose and bitter, two consumption's profiles emerged

As expected, the consumption from the bitter capillary decreased with the concentration of the bitter substance. At 10 mM, flies completely avoided to consume denatonium, quinine and berberine (**Figure 12C**). Opposite to that, the consumption of sucrose for denatonium, quinine, berberine, paraquat and caffeine, increased with bitter concentrations. However, if we plot the consumption of flies after 2 h from both capillaries, for a choice experiment, we obtain 2 dose-response curves.

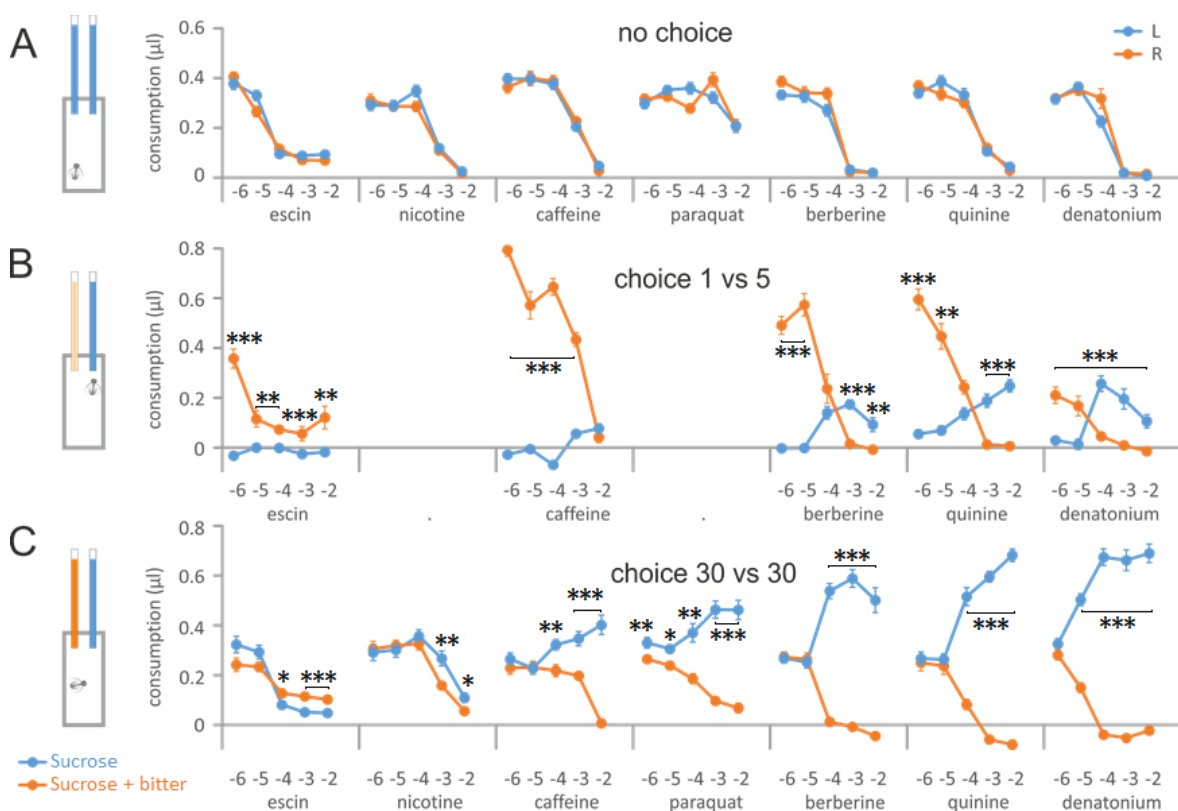


Figure 12 : Drosophila's consumption after 2 hours shows their avoidance of bitter tastants

Average consumption of the flies after 2 hours in the different experiments, (A) when the solution in the capillaries are both bitter, (B) when the sucrose concentration is unbalanced, and (C) when the sucrose concentration is balanced. A Wilcoxon paired test was performed,  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Error bars are SEM.

The first one for caffeine, paraquat, berberine, quinine and denatonium, is the same (**Figure 12C**). The more the concentration in bitter increases, the less the flies eat this solution and the more they favor the solution with sucrose only. Those curves are what we expected to see.

However, even if they have the same characteristics, we can see that for some compounds the flies do not choose the sucrose solution until the bitter concentration are a little bit higher (berberine, caffeine, quinine) contrary to denatonium or paraquat where they prefer the sucrose solution almost immediately.

The second curve profile is for nicotine and escin. We observe that the more the concentration of bitter increases, the less the flies eat from the two capillaries (**Figure 12C**). For escin, between 0.01mM and 0.1mM, it appears to be a switch of perception occurring. Indeed, the total consumption decreases and the flies prefer significantly the escin solution over the sucrose solution (**Figure 12A and B**). Flies can make the difference, but the bitter taste does not seem to be strong enough to generate the preference of the sucrose solution. However, the fall of the total consumption indicates that at the higher concentrations something is different and impact their intake of solution.

As for nicotine, we can see that the two curves follow each other and that the consumption drastically decrease at 1 and 10mM. That makes me think that flies have difficulties perceiving nicotine and that at the higher concentrations, its ingestion causes a sickness-like feeling and the flies stop to eat altogether because they don't know what made them sick. However, even with the decrease in consumption, the flies still prefer the sucrose only solution contrary to what we observe with escin.

When we replicate with the exact two-choice assay conditions from Weiss' paper (Weiss, Dahanukar et al. 2011), for the four compounds and quinine, the curves profiles are different (**Figure 12B**). In the paper, the iso-attractive point was extrapolated from the preference index of the flies. However, with our multiCAFE assay the iso-attractive point is when the curve of the consumption of sucrose crosses the sucrose + bitter curve. We can see that for the escin, the two curves never intersect which goes against what was previously found in the paper (**Figure 12B**). Escine has once again a strange behavior and we can understand how it got to be the least bitter in the scale as it relies on absorption from the flies which is very poor with this compound.

To conclude, we showed that with our multiCAFE device, we have more information than with the classic two-choice assay. Even if two different compounds are close on a bitter scale, with the actual consumption of the flies we can see if they eat a lot of the solutions or not. Moreover,

we can detect compounds with a strange behavior, such as escin here, which is not possible with a binary agar assay. Our experiments are done over two hours but we can make them last over a couple of days with the right experimental conditions.

### **Preference index and bitter scale**

With the data from our short-term choice experiment we can calculate a preference index (PI) with a formula similar to the one that Weiss uses to create her bitter scale. The main difference is that our scale is based on the actual consumption of flies and not whether or not they eat at all. This method allows us to be more accurate in the making of a bitter scale.

Because our sucrose concentration is balanced between the capillaries, our preference index can go from 1, total preference of the bitter substance, to 0, total preference for the sucrose only (**Figure 13A**). We observe that for our 7 compounds, at the lowest concentration of 0.001mM, they are all grouped around a PI of 0.5 which is consistent with a weak bitter perception and a balanced concentration of sucrose. To mimic the iso-attractive concentration found in Weiss, we take half of the value when there is only sucrose in the capillaries as the threshold, meaning -0.5 (**Figure 13A**).

The more the bitter concentration increases, the more the compounds behave differently. Denatonium is the most bitter followed by berberine, quinine, paraquat and caffeine (**Figure 14A**). In the range that we tested, nicotine never crosses the bar to allow us to rank it on the scale. By contrast to all the other, escin has a totally different behavior. We observe that the more its concentration rises, the more the flies seem to prefer it to sucrose only, but it never crosses the bar as well.

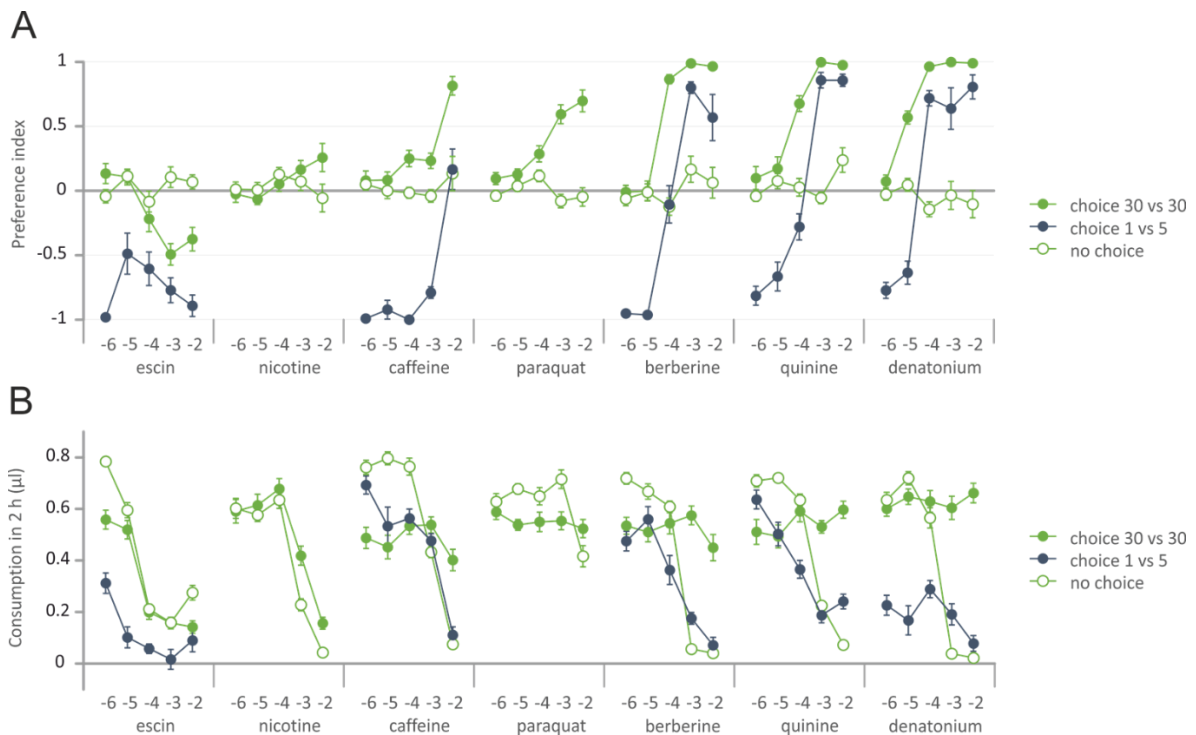


Figure 13 : Preference index and total consumption

(A) Preference index calculated with the following formula,  $PI = [(consumption\ of\ sucrose + compound) - (consumption\ of\ sucrose)] / (total\ consumption)$ . A PI values of 1 means that the flies prefer the solution of bitter molecule(+sucrose) and -1 means that the flies prefer the solution of sucrose. (B) Total consumption for CS flies in a no choice experiment (green/ mpty circle), in a sugar 30/sugar 30+bitter choice experiment (green/full circle), and in a sugar 1mM/sugar 5mM+bitter choice experiment (grey). For the no choice experiment, flies are allowed to feed on two capillaries filled with the same of 30mM sucrose + bitter compound solution. We see here the average total consumption for each concentration of bitter compound after 120min when they had a choice or not. Error bars are SEM.

The PI scale (**Figure 13A**) concurs with the fix timepoint observations that we showed previously meaning that the faster the flies choose the sucrose solution, the more bitter a substance is. In this respect, it is not surprising that the two compounds that differed from the rest are the ones that are harder to place on a scale.

Furthermore, when we unbalance the sucrose as it is usually done in standard agar two-choice assays, we observe once again a strange behavior for escin (**Figure 13A**). Nevertheless, for the other four compounds tested can be scaled and we see that when the sucrose is unbalanced, even if it is less concentrated, the compounds appear to be less bitter (**Figure 13B**). In the two scales, when the bitter potential seems to be shifted to the right for every substance.



With our multiCAFE device we are able to provide a more accurate visualization of the feeding behavior of flies and make a more representative bitter scale.

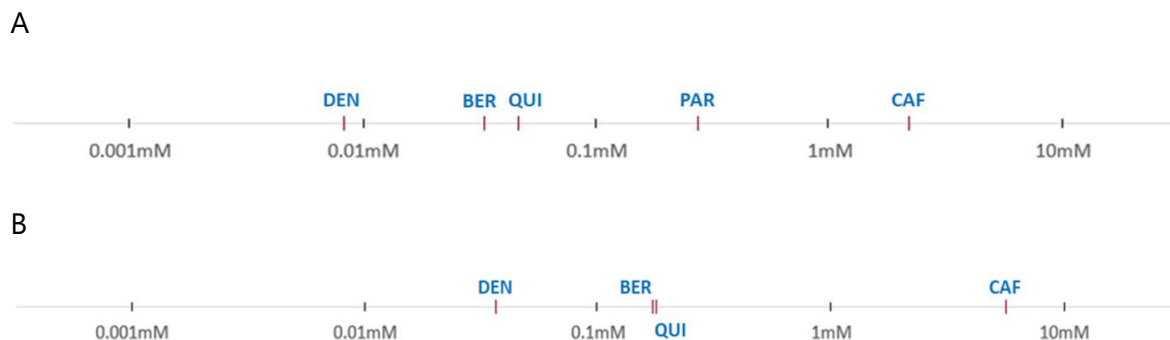


Figure 14 : Scales of bitterness from preference index

Isoattractive concentrations for each bitter tastant. (A) Scale obtained from the crossing of the preference index and -0.5 which is half the preference index when there is only sucrose 30mM in both capillaries. (B) The second was done in the same way, but this time by crossing the PI of 0, for the experiment with the unbalanced sucrose concentration, 1mM and 5mM. We are unable to calculate one for escin and nicotine in the choice30-30 experiments

### The total consumption of flies shows their behavior towards bitterness

In a second experiment, we looked at the total consumption of the flies when they can choose between the two solutions as in the previous experiment, and when they are presented with two identical solutions of sucrose 30mM and bitter.

What we observe is, once again, two curve profiles (**Figure 13B**). The first one, is quite clear for caffeine, berberine, quinine and denatonium. In the choice experiment, the flies make up for the decrease of the bitter solution's consumption by eating more sucrose and the total consumption stays about the same over our range of concentrations. However, in the no choice experiment, the overall consumption decreases for the two highest concentrations, 1 and 10mM as the bitter taste overpowers the flies.

Paraquat has an intermediate profile where the total consumption for the choice experiment is constant as caffeine, berberine, quinine and denatonium. But, on the contrary, its total

consumption in the no choice experiment appears to decrease slightly but is not significantly lower than the one in the choice experiment at 10mM and is even higher at 1mM.

The second curve's profile is for escin and nicotine which cross-check with the data for the choice experiment. The total consumption, in both experiments and for both compounds, decreases the more the concentration increases.

### **Gr66a<sup>ex83</sup> and W1118 flies**

The Gr66a ex83 mutant has existed since 2006, it was generated from W<sup>1118</sup> flies and has been shown to have a problem in detecting caffeine. The first thing that we did was to present a choice in the multiCAFE to the mutant. We tested 3 compounds, quinine, nicotine and caffeine. The Gr66a<sup>ex83</sup> and W<sup>1118</sup> response to quinine is similar to the one already observed for CS flies. The more the concentration in quinine increases, the more the flies consume sucrose (**Figure 15A**). Even though the mutant consumption of sucrose is not as marked as the one of W<sup>1118</sup>, we can still clearly see that they are behaving in the same manner. With our lines counteracting the bitter effect on the overall consumption which leads us to think, once again, that for quinine, the flies are having a rejection response mediated through gustatory receptors (**Figure 15B**).

Moreover, for nicotine, our mutant line and its control have the same curve's profile. The more the concentration of nicotine increases, the less the flies eat from both capillaries (**Figure 15A**). In total consumption, this behavior translates into a decrease of the overall consumption the more they eat, CS flies presented the same behavior (**Figure 15B and Figure 13C**).

Lastly, we observe that for the experiment with caffeine, the Gr66a ex83 mutant did not appear to make up for the elevated concentration of caffeine by increasing their consumption of sucrose like our wild type flies did (**Figure 15**). However, the W<sup>1118</sup> flies, which are the control flies, have the same behavior and that was unexpected. We thought that the W<sup>1118</sup> would have had the same response as CS flies when in the presence of caffeine. This result suggests that the gene *White* may be involved in gustatory reception. Moreover, the perception of caffeine for *Drosophila melanogaster* is, for the most part, the business of peripheral chemoreceptors. Indeed, when Gr66a, which is the major bitter receptor, is inactivated, the initial response cannot be observed.

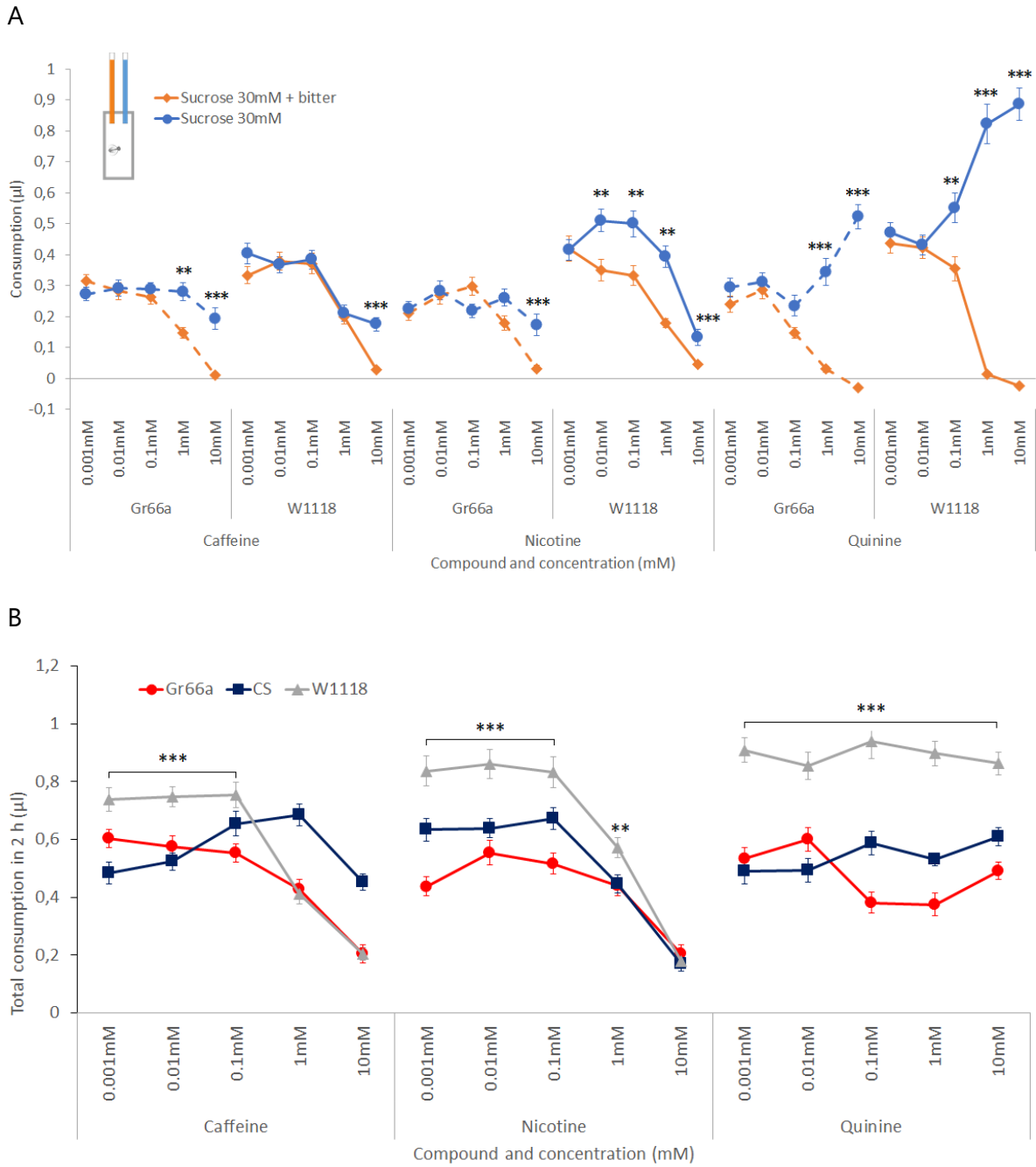


Figure 15 : Gr66a ex83 and W1118 bitter consumption after 2 hours

(A) Consumption for mutant Gr66a ex83 flies (dashed line) in a choice experiment and for W1118 flies (full line) in a similar experiment at t=120min. Flies are allowed to feed on two capillaries. One is filled with a solution of 30mM sucrose (blue/circle) and the other one is filled with a solution of 30mM sucrose + bitter compound (orange/diamond). We see here the average consumption for each concentration of caffeine, nicotine and quinine after 120min. (B) Total consumption for CS flies (square/blue), Gr66a ex 83 (circle/red) and W1118 (triangle/grey) in a choice experiment at t=120min. We compare only the three compounds tested for the mutant and its control. Wilcoxon paired test (A) and unpaired (B) were performed,  $p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ ,  $*** p < 0.001$ . Error bars are SEM.

#### 4. CONCLUSION/DISCUSSION

Feeding behavior is a well-studied and an often-used parameter to evaluate the fitness and survival of insects and most particularly flies from the *Drosophila* family (Silva-Soares *et al.* 2017; Ponton *et al.* 2020). It is known that *D. melanogaster* can regulate its food intake and choose the most appropriate diet to its physiological needs (Camus *et al.* 2018). In this paper we are interested in the aversive response that flies show towards seven molecules, when presented a choice.

With our modify version of the CAFE assay (Ja *et al.* 2007), we are able to offer a choice in the stimulus that are presented to the flies and follow the actual consumption for individual flies over time, which is a great advantage over the classic agar two-choice assay method (Tanimura *et al.* 1982). The curves are informative to visualize when flies are starting to make a clear choice and follow the average consumption over the two-hour period that we are interested in. This type of recording is valuable when couple with the fix time-point data used to calculate the preference index.

Although in the literature the sugar content in a two-choice assay is always unbalanced, the results obtained are difficult to interpret. Sugar is needed as an incentive for the flies to eat, otherwise they are not motivated even if they are starved, but when sugar is mixed with bitter, the compounds interact with each other (Keast and Breslin 2002). Sugar tends to mask the bitter taste, so if the concentration of sugar mixed with bitter is higher than the solution to which it is compared to, the solution consumption should indicate more a sugar preference than a real bitter avoidance.

In this paper, it is the first time that consumption is coupled with the preference index for a bitter compound and that is why we are able to observe a new kind of aversive response. Thanks to the multiCAFE we are able to observe two behavioral strategies. The first one is expected, i.e., the higher the concentration of bitter is, the less the flies eat the bitter solution and the more they only eat the sucrose-only solution. With this response we can see that the flies, in order to counteract the bitterness, they encounter, consume more sucrose but they still maintain their overall total consumption at the same levels.

The second strategy is a decrease of the consumption in both capillaries. The consumption of the two solutions is close to one another, which can only mean two things, either the bitter taste is not strong enough to deter them, or the flies have trouble perceiving the bitterness of the compounds. For nicotine and escin this suggests that flies perceive the bitterness but have trouble identifying in which solution it is present or it makes them feel sick and they stop eating altogether.

However, the most interesting observation is of escin. For Weiss (Weiss *et al.* 2011), it was the least bitter but with the consumption data we can see that it is not that simple as that. At very low concentrations, flies eat equally the solution of sucrose than the solution of sucrose+escin. However, toward to medium concentrations, the flies seem to prefer the sucrose solution only to switch again and choose the sucrose+escin solution at the highest concentrations with consumption levels close to zero. That is why the real consumption is more accurate than the evaluation of the coloration of the flies' abdomen to infer a bitter scale and it allows us to put in perspective the preference index.

Finally, the next step to deepen our observations would be to look at the consumption and behavior of flies over their lifespan when they only have access to a bitter solution in order to look at the toxicity of the compounds. Indeed, in the literature we usually do not have the consumption of individual flies and their exact time of death (Kojima *et al.* 2018; Rimal and Lee 2019) as they mainly focus on short-term response to a bitter stimulus.

## Acknowledgments

This work received support from ABIES / Paris Saclay and from ANR BITTERTOIX. We thank Stephane Dallongeville, developer of Icy, for his continuous and friendly support while developing the Java plugins described here. We thank all members of the laboratory for continuous support and fruitful discussions.

## 5. REFERENCES

- Beauchamp, G. K. and P. Jiang (2015). "Comparative biology of taste: Insights into mechanism and function." Flavour **4**(1): 9.
- Behmer, S. T., D. O. Elias and E. A. Bernays (1999). "Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper." Journal of Experimental Biology **202**(6): 739-748.
- Bernays, E. A. and R. F. Chapman (2000). "A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths." Journal of Insect Physiology **46**(6): 905-912.
- Bernays, E. A., S. Oppenheim, R. F. Chapman, H. Kwon and F. Gould (2000). "Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars." Journal of Chemical Ecology **26**(2): 547-563.
- Camus, M. F., C. C. Huang, M. Reuter and K. Fowler (2018). "Dietary choices are influenced by genotype, mating status, and sex in *Drosophila melanogaster*." Ecology and Evolution **8**(11): 5385-5393.
- David, J. R. (1962). "A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions." Drosophila Information Service **36**: 128.
- Davis, C. J., R. K. Harding, R. A. Leslie and P. L. R. Andrews (1986). "The Organisation of Vomiting as a Protective Reflex." Nausea and Vomiting : Mechanisms and Treatment: 65-75.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour and J. C. Olivo-Marin (2012). "Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research." Nature Methods **9**(7): 690-696.
- Delventhal, R. and J. R. Carlson (2016). "Bitter taste receptors confer diverse functions to neurons." eLife **5**: 23.
- Dethier, V. G. (1976). The Hungry Fly. A Physiological Study of the Behavior Associated with Feeding. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
- French, A. S., M.-J. Sellier, M. Ali Agha, A. M. A. Guigue, M.-A. Chabaud, P. D. Reeb, A. Mitra, Y. Grau, L. Soustelle and F. Marion-Poll (2015). "Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*." Journal of Neuroscience **35**(9): 3990-4004.
- Ganchrow, J. R., J. E. Steiner and M. Daher (1983). "Neonatal Facial Expressions in Response to Different Qualities and Intensities of Gustatory Stimuli." Infant Behavior and Development **6**(4): 476-484.
- Glendinning, J. I. (1994). "Is the bitter rejection response always adaptive?" Physiology & Behavior **56**(6): 1217-1227.
- Glendinning, J. I. (1996). "Is chemosensory input essential for the rapid rejection of toxic foods?" Journal of Experimental Biology **199**(Pt 7): 1523-1534.
- Gouin, A., A. Bretaudeau, K. Nam, S. Gimenez, J. M. Aury, B. Duvic, F. Hilliou, N. Durand, N. Montagne, I. Darboux, S. Kuwar, T. Chertemps, D. Siaussat, A. Bretschneider, Y. Mone, S. J. Ahn, S. Hanniger, A. S. G. Grenet, D. Neunemann, F. Maumus, I. Luyten, K. Labadie, W. Xu, F. Koutroumpa, J. M. Escoubas, A. Llopis, M. Maibeche-Coisne, F. Salasc, A. Tomar, A. R. Anderson, S. A. Khan, P. Dumas, M. Orsucci, J. Guy, C. Belser, A. Alberti, B. Noel, A. Couloux, J.

- Mercier, S. Nidelet, E. Dubois, N. Y. Liu, I. Boulogne, O. Mirabeau, G. Le Goff, K. Gordon, J. Oakeshott, F. L. Consoli, A. N. Volkoff, H. W. Fescemyer, J. H. Marden, D. S. Luthe, S. Herrero, D. G. Heckel, P. Wincker, G. J. Kergoat, J. Amselem, H. Quesneville, A. T. Groot, E. Jacquin-Joly, N. Negre, C. Lemaitre, F. Legeai, E. d'Alencon and P. Fournier (2017). "Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges." Scientific Reports **7**: 12.
- Hong, W. and H. B. Zhao (2014). "Vampire bats exhibit evolutionary reduction of bitter taste receptor genes common to other bats." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **281**(1788): 20141079.
- Hosamani, R. and Muralidhara (2013). "Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **83**(1): 25-40.
- Itskov, P. M., J. M. Moreira, E. Vinnik, G. Lopes, S. Safarik, M. H. Dickinson and C. Ribeiro (2014). "Automated monitoring and quantitative analysis of feeding behaviour in *Drosophila*." Nature Communications **5**: 4560.
- Ja, W. W., G. B. Carvalho, E. M. Mak, N. N. de la Rosa, A. Y. Fang, J. C. Liang, T. Brummel and S. Benzer (2007). "Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(20): 8253-8256.
- Jacobs, W. W., G. K. Beauchamp and M. R. Kare (1978). Progress in Animal Flavor Research. Flavor Chemistry of Animal Foods, Washington, DC, American Chemical Society.
- Keast, S. J. R. and P. A. S. Breslin (2002). "An overview of binary taste-taste interactions." Food Quality and Preference **14**(2): 111-124.
- Kim, S. H., Y. Lee, B. Akitake, O. M. Woodward, W. B. Guggino and C. Montell (2010). "*Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(18): 8440-8445.
- Kirkness, E. F., B. J. Haas, W. L. Sun, H. R. Braig, M. A. Perotti, J. M. Clark, S. H. Lee, H. M. Robertson, R. C. Kennedy, E. Elhaik, D. Gerlach, E. V. Kriventseva, C. G. Elisk, D. Graur, C. A. Hill, J. A. Veenstra, B. Walenz, J. M. C. Tubio, J. M. C. Ribeiro, J. Rozas, J. S. Johnston, J. T. Reese, A. Popadic, M. Tojo, D. Raoult, D. L. Reed, Y. Tomoyasu, E. Krause, O. Mittapalli, V. M. Margam, H. M. Li, J. M. Meyer, R. M. Johnson, J. Romero-Severson, J. P. VanZee, D. Alvarez-Ponce, F. G. Vieira, M. Aguade, S. Guirao-Rico, J. M. Anzola, K. S. Yoon, J. P. Strycharz, M. F. Unger, S. Christley, N. F. Lobo, M. J. Seufferheld, N. K. Wang, G. A. Dasch, C. J. Struchiner, G. Madey, L. I. Hannick, S. Bidwell, V. Joardar, E. Caler, R. F. Shao, S. C. Barker, S. Cameron, R. V. Bruggner, A. Regier, J. Johnson, L. Viswanathan, T. R. Utterback, G. G. Sutton, D. Lawson, R. M. Waterhouse, J. C. Venter, R. L. Strausberg, M. R. Berenbaum, F. H. Collins, E. M. Zdobnov and B. R. Pittendrigh (2010). "Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(27): 12168-12173.
- Kojima, T., A. Furuyama, K. Isono, T. Hamada, K. Ohsuga and S. Takada (2018). "Effects of salt taste disorder on behavior and lifespan in *Drosophila melanogaster*." Journal of Oral Biosciences **60**(1): 15-20.
- Lai, Y., E. Despouy, J. C. Sandoz, S. K. Su, M. G. D. Sanchez and M. Giurfa (2020). "Degradation of an appetitive olfactory memory via devaluation of sugar reward is mediated by 5-HT signaling in the honey bee." Neurobiology of Learning and Memory **173**: 13.

- Lee, J. C. and E. A. Bernays (1990). "Food tastes and toxic effects: associative learning by the polyphagous grasshopper *Schistocerca americana* (Drury) (Orthoptera: Acrididae)." Animal Behaviour **39**(1): 163-173.
- Lee, Y., S. J. Moon and C. Montell (2009). "Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(11): 4495-4500.
- Lee, Y., S. J. Moon, Y. J. Wang and C. Montell (2015). "A *Drosophila* gustatory receptor required for strychnine sensation." Chemical Senses **40**(7): 525-533.
- Li, D. Y. and J. Z. Zhang (2014). "Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire." Molecular Biology and Evolution **31**(2): 303-309.
- Li, X., W. Li, H. Wang, J. Cao, K. Maehashi, L. Huang, A. A. Bachmanov, D. R. Reed, V. r. Legrand-Defretin, G. K. Beauchamp and J. G. Brand (2005). "Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar." PLoS Genetics **1**(1): e3.
- Marion-Poll, F. (2020). MultiCAFE. <http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/multicafe/>.
- McBride, C. S. (2007). "Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(12): 4996-5001.
- McBride, C. S. and J. R. Arguello (2007). "Five *Drosophila* genomes reveal nonneutral evolution and the signature of host specialization in the chemoreceptor superfamily." Genetics **177**(3): 1395-1416.
- Meunier, N., F. Marion-Poll, J. P. Rospars and T. Tanimura (2003). "Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*." Journal of Neurobiology **56**(2): 139-152.
- Minnich, D. E. (1921). "An experimental study of the tarsal chemoreceptors of two nymphalid butterflies." Journal of Experimental Zoology **33**(1): 172-203.
- Moon, S. J., M. Kottgen, Y. C. Jiao, H. Xu and C. Montell (2006). "A taste receptor required for the caffeine response *in vivo*." Current Biology **16**(18): 1812-1817.
- Moon, S. J., Y. Lee, Y. Jiao and C. Montell (2009). "A *Drosophila* gustatory receptor essential for aversive taste and inhibiting male-to-male courtship." Current Biology **19**(19): 1623-1627.
- Muñoz, I. J., P. E. Schilman and R. B. Barrozo (2020). "Impact of alkaloids in food consumption, metabolism and survival in a blood-sucking insect." Scientific Reports **10**(1): 10.
- Ponton, F., J. Morimoto, K. Robinson, S. S. Kumar, S. C. Cotter, K. Wilson and S. J. Simpson (2020). "Macronutrients modulate survival to infection and immunity in *Drosophila*." Journal of Animal Ecology **89**(2): 460-470.
- Rimal, S. and Y. Lee (2019). "Molecular sensor of nicotine in taste of *Drosophila melanogaster*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **111**: 7.
- Robertson, H. M., R. L. Baits, K. K. O. Walden, A. Wada-Katsumata and C. Schal (2018). "Enormous expansion of the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach *Blattella germanica*." Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution **330**(5): 265-278.
- Sellier, M.-J., P. Reeb and F. Marion-Poll (2011). "Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions." Chemical Senses **36**(4): 323-334.



- Shim, J., Y. Lee, Y. T. Jeong, Y. Kim, M. G. Lee, C. Montell and S. J. Moon (2015). "The full repertoire of *Drosophila* gustatory receptors for detecting an aversive compound." Nature Communication **6**.
- Silva-Soares, N. F., A. Nogueira-Alves, P. Beldade and C. K. Mirth (2017). "Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*." Bmc Ecology **17**: 13.
- Simoës, P. M. V., S. R. Ott and J. E. Niven (2012). "A long-latency aversive learning mechanism enables locusts to avoid odours associated with the consequences of ingesting toxic food." Journal of Experimental Biology **215**(10): 1711-1719.
- Sung, H. Y., Y. T. Jeong, J. Y. Lim, H. Kim, S. M. Oh, S. W. Hwang, J. Y. Kwon and S. J. Moon (2017). "Heterogeneity in the *Drosophila* gustatory receptor complexes that detect aversive compounds." Nature Communications **8**: 10.
- Tanimura, T., K. Isono, T. Takamura and I. Shimada (1982). "Genetic dimorphism in the taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*." Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology **147**(4): 433-437.
- Thorne, N., C. Chromey, S. Bray and H. Amrein (2004). "Taste perception and coding in *Drosophila*." Current Biology **14**(12): 1065-1079.
- Wada-Katsumata, A., J. Silverman and C. Schal (2013). "Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behavior in cockroaches." Science **340**(6135): 972-975.
- Weiss, L. A., A. Dahanukar, J. Y. Kwon, D. Banerjee and J. R. Carlson (2011). "The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*." Neuron **69**(2): 258-272.
- Wright, G. A., J. A. Mustard, N. K. Simcock, A. A. R. Ross-Taylor, L. D. McNicholas, A. Popescu and F. Marion-Poll (2010). "Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee." Current Biology **20**(24): 2234-2240.
- Xu, W., A. Papanicolaou, H. J. Zhang and A. Anderson (2016). "Expansion of a bitter taste receptor family in a polyphagous insect herbivore." Scientific Reports **6**: 10.
- Yildiz, D. (2004). "Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects." Toxicol **43**(6): 619-632.
- Zhao, H. B., Y. Y. Zhou, C. M. Pinto, P. Charles-Dominique, J. Galindo-Gonzalez, S. Y. Zhang and J. Z. Zhang (2010). "Evolution of the sweet taste receptor gene *Tas1R2* in bats." Molecular Biology and Evolution **27**(11): 2642-2650.

# Chapitre 2



# CHAPITRE 2 : ALIMENTATION ET SURVIE

## SUR MILIEU AMER

---

Une hypothèse très répandue dans la littérature est que l'amertume est synonyme de toxicité. Toutefois, tous les êtres vivants n'ont pas les mêmes capacités de détection de l'amertume. En effet, le régime alimentaire participe beaucoup à l'évolution du système gustatif. Il est possible d'observer l'apparition ou la disparition de gènes de récepteurs gustatifs lorsque les individus sont fortement ou jamais confrontés à certaines modalités gustatives.

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai voulu tester l'hypothèse de la relation entre l'amertume et la toxicité chez *Drosophila melanogaster*. C'est une espèce relativement polyphage et qui a de nombreux récepteurs spécialisés dans la détection de l'amertume.

J'ai voulu séparer les deux grandes questions, déterminer l'amertume d'un composé mais aussi sa toxicité. Pour ce faire j'ai utilisé des injections au niveau de l'abdomen de la drosophile mais aussi des tests de consommation qui permettent de suivre la quantité ingérée par la mouche et sa survie. J'ai regardé si une corrélation émergeait.

Cette étude a été rédigée sous forme d'article destiné à être publié.

# Is there a link between bitterness and toxicity of aversive compounds in *Drosophila melanogaster*?

Authors: Perrine Colombi<sup>a</sup>, Solène Travaillard<sup>a</sup>, Béatrice Denis<sup>a</sup>, Ghazlene Mekhloufi, Frédéric Marion-Poll<sup>a, b</sup>

Addresses: (a) UMR Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie, CNRS-IRD-Univ. Paris-Saclay, Université Paris Saclay, Campus CNRS, Bâtiment 13, BPI – 91198 Gif-sur-Yvette – France

(b) AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris – France

Key words: *Drosophila melanogaster*, bitter, toxicity, consumption, multiCAFE

## Summary

Taste is a sense shared by all animals. The number of taste receptors and their specificity are linked to their diet breadth. Polyphagous animals tend to possess more taste receptors tuned to bitter substances as compared to appetitive substances, because they are potentially exposed to more toxic molecules than specialists. If a molecule is toxic, it is advantageous to detect it as bitter, as it helps animals to avoid ingesting it. However, a relation between bitterness and toxicity has not been proven. When animals are fed with food spiked with bitter compounds, it is actually quite difficult to evaluate if animals are affected by post-ingestive toxicity or simply by starvation resulting from feeding inhibition.

Here, we examined the aversiveness and toxicity of a panel of 7 “bitter” molecules earlier shown to be avoided by adult flies in feeding experiments and sensed by bitter-sensitive gustatory cells. When mixed with 30 mM sucrose in agar, the lifespan of adult flies was reduced by each of these molecules in a dose dependent way. We evaluated their toxicity by recording the lifespan of flies after injection into the abdomen. We also monitored the consumption of solutions of 30mM sucrose mixed with bitter compound at different concentrations over the entire lifespan of the flies. Contrary to our initial expectations, our observations do not indicate a strong relation between bitterness and toxicity. This paradox is discussed.

## 1. INTRODUCTION

In humans, the sense of taste is defined by five different components: sweet, salty, umami, sour and bitter. These psychological categories are based on the expression of families of gustatory genes, which are either membrane channel or protein coupled receptors (Li *et al.* 2002). In Vertebrates, there is three receptors for sugars and amino acids (T1R1-3) (Nelson *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2003), and about 30 receptors for bitter substances (T2Rs) (Adler *et al.* 2000; Scott 2005). Similar categories and genes have been found in other animals although insect gustatory receptors belong to a totally different family than those of Vertebrates (Liman *et al.* 2014). In *Drosophila melanogaster*, a family of 68 putative taste receptor proteins (encoded by 60 genes) and called GR receptors, has been identified (Clyne *et al.* 2000). While 9 genes encode receptors sensitive to sugars, about 30 to 40 of them are thought to encode for receptors tuned to aversive molecules.

If the gustatory sensitivity is linked to the detection of molecules of important ecological valence, then an aversive behavior towards a gustatory stimulus is likely to be an adaptation to the noxiousness of this stimulus: it allows animals to avoid ingesting potentially toxic compounds. The majority of species possess a bitter taste – the capacity to detect substances brought in contact with the mouth inducing a sequence of aversive reflexes like, tongue retraction, gaping, increased latency to swallow, lowered heart rate, and nausea (Bergvall and Leimar 2005). The convergent evolution of the behavioral response to bitter tastes, and the fact that most natural poisons are bitter to humans, support the hypothesis that this taste modality participates in the avoidance of toxin ingestion (Behrens and Meyerhof 2006).

Toxins and/or bitter compounds are commonly found in the diet of herbivores. Plants are known to produce a wide variety of defensive compounds (Ibanez *et al.* 2012). These defense compounds are called secondary compounds as opposed to primary compounds like sugars, amino acids or vitamins, essential for the growth and reproduction of plants. These secondary compounds are often concentrated in the most nutritive tissues, thus allowing the protection of the plant against herbivorous animals (Glendinning *et al.* 2001b). Some phytophagous insects have diverted this mechanism to their advantage by sequestering these noxious substances, which have become phagostimulants for them, thus becoming themselves bitter and/or toxic for their own predators (Nishida and Fukami 1990). Despite the seemingly

simplicity of the link between bitterness and toxicity, the relationship and the validation in living organisms is not well studied. Even though the behavioral response is often similar, bitterness is not unanimously perceived and sometimes varies between compounds for a same species, and between species for a same compound (Glendinning 1994).

Paradoxically, while omnivorous insects are equipped with more bitter receptors than insects with a specialized diet, they seem to be less responsive to bitter chemicals (Bernays and Chapman 2000; Bernays *et al.* 2000). Herbivorous species need to adapt to diets containing variable amounts of bitter compounds because otherwise, a high bitter sensitivity (i.e., low bitter concentration threshold) would cause animals to taste-reject nontoxic and nutritious foods (Bernays *et al.* 2000). A high bitter taste threshold would be necessary because browsers cannot "afford" to reject all foods that are bitter and only potentially toxic without drastically restricting their dietary option (Jacobs 1978). On the contrary, carnivorous species are rarely exposed to toxic / bitter taste in their food. They may have evolved a bitter threshold that was low enough to cause them to reject virtually all potentially toxic foods they encounter (Glendinning 1994).

The relation between bitterness and toxicity has not yet been really addressed in *Drosophila* species. It seems fair to propose that *Drosophila melanogaster* adapts its food consumption to its internal needs (Simpson and Raubenheimer 1996) and avoid ingesting noxious molecules. Several studies show that *D. melanogaster* is sensitive to bitter substances, especially alkaloids such as quinine, strychnine, or caffeine (Meunier *et al.* 2003; Moon *et al.* 2006). In adult flies, this avoidance is thought to be mediated via the activation of contact chemoreceptors, which are housed in hair-like structures, called sensilla, located on the mouthparts, legs, wings margin, and the ovipositor (Stocker 1994; Mitchell *et al.* 1999). Several bitterness scales have been proposed in the last few years (Weiss *et al.* 2011; Chen *et al.* 2019) but they are mostly based on behavioral observations of flies feeding choices. One study however dots to a relation between bitterness and toxicity in *Drosophila*, (Zhang *et al.* 2013b), suggesting that flies can desensitize to non-toxic stimuli like camphor, but not to a toxic stimulus like quinine.

Here, we selected seven compounds previously known to be toxic and perceived as bitter for humans. These seven molecules are naturally occurring alkaloids (berberine, caffeine, nicotine

and quinine) and saponine (escin), and synthetic compounds known to be toxic to flies (paraquat, a pyridine) or to be particularly bitter (denatonium benzoate, a benzoic salt). Many of them have been tested on *Drosophila melanogaster* and elicit an avoidance behavior (Moon *et al.* 2006; Montell 2009; Sellier *et al.* 2011; El-Keredy *et al.* 2012). In order to evaluate a possible link between the toxicity of these compounds and their bitterness, we compared their biological activity using different tests. First, we monitored the impact of these chemicals mixed into an agar diet upon the lifespan of flies. Since such tests most likely mix effects involving avoidance and toxicity, we also monitored the lifespan of flies after injecting different doses of these compounds into their abdomen. Lastly, we also monitored the lifespan as well as the amount of diet ingested by flies using long-term multiCAFE assays. As the efficiency of these chemicals differs in the different assays, this suggests that bitterness and toxicity are not strictly correlated. We also observed that flies' lifespan given diet mixed with these chemicals is correlated to the amount of sugar ingested rather than to the number of toxic molecules.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### **Drosophila stocks**

Canton S (Bloomington: BSC 64349) were grown on axenic medium (David 1962) : 12g agar, 83g dried yeast (LCS Whole Yeast 50, Lesaffre Culinary Strasbourg, France), 83g roasted corn flour (farine de gaudes, Les graines du Père Pajo, France), 6.9g nipagin (VWR, France; CAS No. 99-76-3), 50 mL ethanol for 1L of water at 25°C, and 75% of relative humidity with a day:night cycle of 12:12. Emerged flies (~0-day old) were first sexed (after numbing them with CO<sub>2</sub>), then transferred to a freshly prepared axenic agar food medium for 3 days, and maintained in a rearing chamber at 25 °C. All tests were performed on males.

### **Chemicals**

Chemicals were from Sigma Aldrich of the highest available purity: sucrose (Sigma-Aldrich, CAS No. 57-50-1, 99.5 % purity), erioglucine (Sigma Aldrich, CAS No. 3844-45-9), berberine chloride (≥98%; CAS No. 633-65-8), escin (≥95%; CAS No. 6805-41-0), quinine hydrochloride (≥99%; CAS No. 6119-47-7), caffeine (≥99%, CAS No. 58-08-2), nicotine hydrogen tartrate



(98%; CAS no. 65-31-6) and paraquat dichloride hydrate (99.9%; CAS no. 75365-73-0). Denatonium benzoate ( $\geq 99.9\%$ ; CAS: 3734-33-6) was obtained from Fluka.

In order to evaluate the amount of liquid ingested by flies, bitter substances were mixed with 30 mM sucrose and  $1.58 \times 10^{-2}$  mM of erioglaucine mixed with ultrapure water, unless noted otherwise. Erioglaucine is a blue dye commonly used in food preparation and is not known to impact drosophila feeding. The solutions were prepared no longer than a week in advance and kept at 4-6 °C.

The concentrations of bitter tastants evaluated in this study were of 10mM, 1mM, 0.1mM, 0.01mM and 0.001mM for liquid consumption. When injected into the abdomen, the concentrations were between 150mM and 0.1mM, adjusted to the solubility of the compounds and the death rate of the flies in order to have concentrations below and over the lethal dose 50 (LD50).

### **Nano-injections**

Flies were collected and sexed after emergence, at day 0, and maintained on axenic medium until day 3. At that time, males were individually transferred into a glass tube plunged into ice during a few minutes to induce narcosis, in order to inject 50nL of a test solution into their abdomen (Nanoject II Auto-Nanoliter Injector, Drummond Scientific). The injection was performed using a glass capillary needle, kept inside the abdomen until the whole volume was injected. The concentrations were adapted to the mortality of the flies, in order to obtain an appropriate range of dose-response curves.

### **Lifespan estimation using a locomotion detector**

Each fly (n=32 per concentration) was enclosed into a 6.5 cm-long  $\times$  6 mm-diameter transparent plastic straw closed at one end with a cotton plug and at the other end with 2 cm of food medium. This food medium was 1% agar with 30mM of sucrose for the flies which received in injection. Flies which were not injected were given access to the same medium, but mixed with different concentration of the test molecules.

For the injection experiments, in addition to the test chemicals tested at different concentrations, we monitored the lifespan of flies (i) injected with water, (ii) with 10% DMSO

(solute in which bitter compounds were dissolved), (iii) not injected but only punctured, or (iv) not injected but only narcosed with ice. For survival experiments, we evaluated the survival of flies on treated diets and on (i) 1% agar with 30 mM sucrose or (ii) on 1% agar.

Each straw was inserted into a locomotion detector (Trikinetics Inc, DAM2) to record the number of times each fly crossed an infrared beam placed at the center of the straw, over a period of 10 to 12 days. The recording devices were disposed in a rearing chamber at 25°C with a day: night cycle of 16:8, at constant humidity. Data were acquired every 5 minutes. The time of death of each individual was defined as the last interval of time at which a movement was detected.

### Capillary feeding tests

All experiments were performed at 25 °C with 65%-70% R.H. in constant light. 3 days old male flies were introduced into individual chambers and given *ad libitum* access to glass capillaries. (10 µL, 32 mm-long; Hirschmann Laborgeräte, VWR, France) filled with different solutions just before the experiment. We used the setup described in Colombi et al. (chap 2) (**Figure 16**).

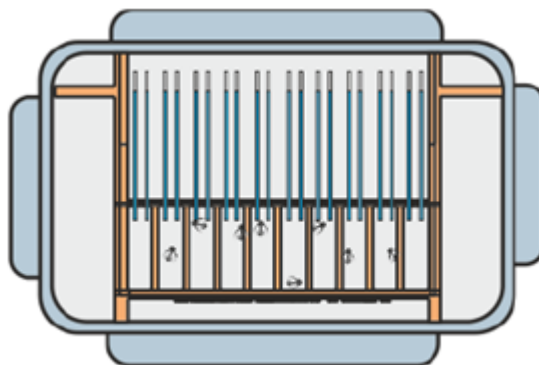


Figure 16 : MultiCAFE device

Schematic representation of the CAFE assay adapted from Ja et al (2007).

Test solutions were colored in blue with erioglaucline in order to facilitate the semi-automatic detection of the liquid level. According to earlier tests, this dye has no effect on taste sensitivity and is not toxic for flies at the used concentration (Tanimura *et al.* 1982). In order to maintain the liquid at the bottom of the capillaries, we added an agar plug (0.5%) at the bottom of the

capillaries. The capillaries were replaced by new ones filled with the same solution every 2 to 3 days.

### **Lethal concentration 50 (LD50) at day 3 and t50 hormesis**

For experiments involving nano-injection into the abdomen, the lethal concentration 50 (LC50) was defined as the concentration at which 50% of flies were dead after 3 days. We chose 3 days because after that time there is a plateau in the survival curve so we associate the first decrease of survival to post-ingestive effects. The LC50 for each compound was estimated using the function `[calcula.lc()]` in R (Pacheco and Rebelo 2013).

In order to evaluate if low doses of each compound were improving survival, we compared the survival curves of injected flies to that of flies injected with 10% DMSO, or for the consumption experiment, to flies placed on a sucrose diet. To compare the lifespan of flies subjected to these different treatments, we computed the t50, which is the time after which 50% of the flies were dead. This parameter was obtained estimating this time from the survival curves.

### **Image capture and analyses**

In order to estimate the amount of liquid consumed by flies, we monitored each cage with a webcam. At a resolution of  $1280 \times 720$  pixels, each capillary (32 mm) was 300 to 400 pixels long and 5-8 pixels wide. The camera (Logitech HD Pro C920) was set to record 1 image per minute using a time-lapse capturing software (iSpy v 7.2.1.0; <http://iSpyConnect.com>). We could record simultaneously from 4 cameras on a regular PC computer under Windows 10, or from 16 cameras using 4 PCIe cards (PEXUSB3S44V, Startech). The analysis of the consumption of the image stacks obtained with the multiCAFE setting was the same as in Colombi et al (chap 2).

For survival analyses, we followed movements of each fly, with a custom program, MultiCAFE (Marion-Poll 2020), running on the ICY image analysis platform (de Chaumont *et al.* 2012). If the position of the fly did not change from a certain number of pixels for 30 minutes, the fly was considered as dead.

## Statistical analyses

For lifespan observations made either with the locomotion monitor (Trikinetics) or with monitoring movement in the multiCAFE cages, each individual was associated with its time of death and its status at the end of the experiment (dead or still alive). These data were used to compute an estimation of the survival curves with the Kaplan-Meier method (Rich *et al.* 2010). These curves were then compared two-by-two with a log-rank test (non-parametrical, adapted to survival data; [survdiff] in the toolset of the package "Survival" in R).

In order to analyze liquid consumption, the images captured were analyzed with a custom plugin under ICY to detect the liquid level in each capillary and these measures were exported to Excel spreadsheet files. Data were then statistically analyzed using R (version 4.0.4), using Wilcoxon paired tests. The correlation between the individual quantity (of toxin or sucrose) and the survival of flies was analyzed with a Spearman test.

## 3. RESULTS

### Survival of flies placed on a sucrose and bitter compound diet

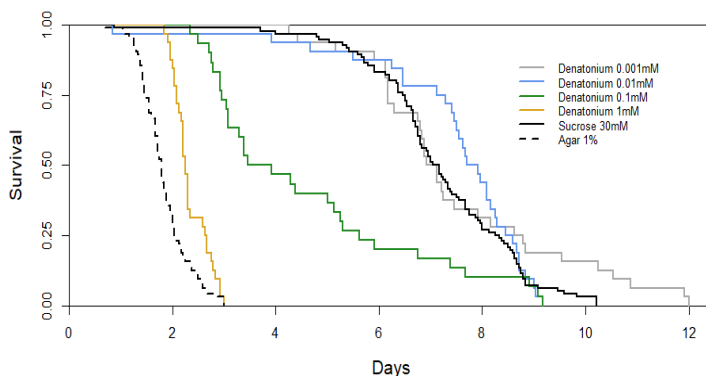
First, we want to see the survival of adult flies when they are fed on a medium where the toxic compound is present and inseparable from the nutritive elements. In order to do so, a food medium was prepared by mixing each bitter compound (at different concentration) with sucrose at 30mM-concentration and agar at 1%. The food was put in individual tubes of an activity monitor device where the survival of individual flies was recorded (**Figure 17A**).

Control flies that only had a 1% agar medium survived up to three days, which correspond to the starvation so this result was expected. The other control flies, the ones only fed on the sucrose 30mM and agar 1% medium, lived from 8 to 10 days. In the case of denatonium (**Figure 17A and Figure 23**) but also nicotine, paraquat and quinine, we observe that the lower the concentration of bitter compound is, the longer the flies live and, in some case, they live longer than the control flies (**Table 2**), this is hormesis. We do not know if this ability to live longer is due to the fact that the flies eat less and regulate their ingestion of toxin or it's the effect of something else, like the activation of detoxification enzymes.

This experiment has a limit. It is not obvious whether the flies die from the toxicity or the bitterness of the compounds. We can imagine that for the highest concentration the bitterness is so strong that flies would rather not eat the noxious food, resulting in starvation. This is why we try to separate the toxicity from the bitterness with two other sets of experiments.

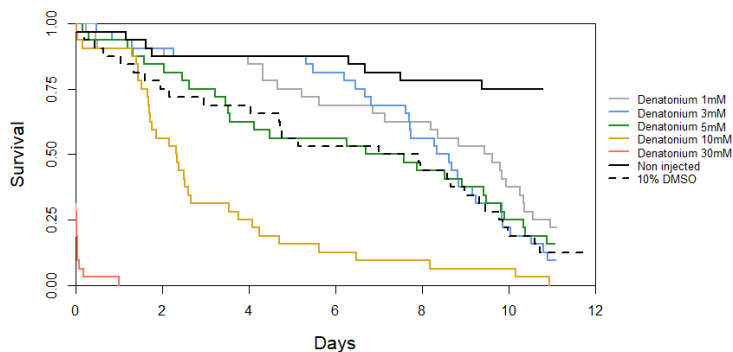
### A

**Agar + sucrose mixed with denatonium**



### B

**Agar + sucrose after injection of denatonium into the abdomen**



### C

**Capillary filled with sucrose mixed with denatonium**

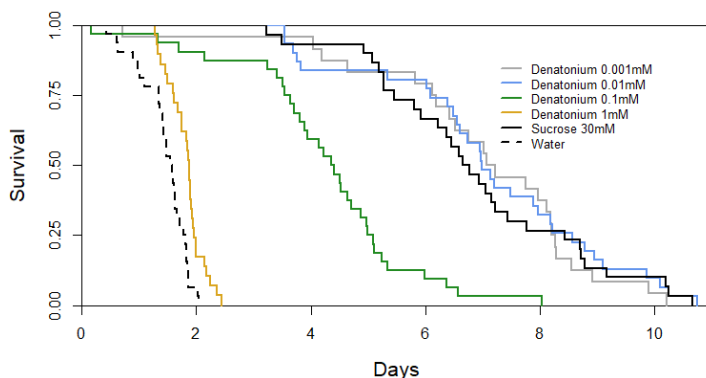


Figure 17: Survival of the flies in three conditions

(A) Survival of flies placed in a transparent tube containing on one end about 2 cm of 1% agar mixed with 30 mM sucrose and denatonium. Each individual tube was placed in an activity monitor, which allowed us to know precisely their time of death. (B) Survival of flies placed on 1% agar mixed with 30 mM sucrose after injection of 50nl of denatonium at different concentrations into their abdomen. (C) Survival of fed in the multiCAFE device with a solution of sucrose and denatonium. One picture was taken every minute and we were able to follow them with the Drosotrack software (Icy). The survival curves were obtained with the Kaplan-Meier method.

## **Survival of flies placed on a sucrose diet following injection of test compounds in the abdomen**

In order to dissociate the toxicity from the bitterness, we injected directly in the fly abdomen the bitter compounds at different concentrations ranging from 0.1mM to 150mM. After the injections, the flies were put in individual tubes, with an agar and sucrose medium, in order to follow their survival over a two weeks period. For this experiment non-injected flies were considered as a control to look at the natural mortality of flies in the device. In addition, flies injected with 10% DMSO solution were considered as a second control. 10% DMSO solution was used to solubilize the bitter compounds (**Figure 17B and Figure 24**).

We observe that for several compounds, the range of concentration is very different, meaning that some molecules are much more toxic than other. It is the case of paraquat which only needs small concentrations to have the same effect as caffeine or quinine for example (**Figure 24**).

Moreover, we can see that there is also an hormetic effect in injection experiment (**Table 1**). Some compounds that presented hormetic properties when mixed with food, also exhibit them with injections, it is the case of quinine, caffeine and nicotine. What is curious is the case of quinine, in both experiments, at the second lowest concentration there are hormetic properties but not at other concentrations. On the contrary, denatonium did not have an hormetic effect here, but escin does.

What we need is an experiment where we can give flies access to the bitter compounds, and determine how much they eat from the medium. It also necessary to be able to follow the survival of the flies. That way we will know if the flies die because they are starving or if they ingest a high amount of toxin, which is fatal to them.

## **Survival of flies feeding on two capillaries of sucrose and bitter compounds**

We use a modification of the CAFE assay which, in one device, at the same time, 8 individual flies are able to feed from two separate capillaries, either with a choice or not (**Figure 1**). Flies stay in the device until they die and their survival is followed. In this experiment, the flies have

access to two capillaries with the same solution of sucrose (30mM) mixed with a bitter compound at a fixed concentration.

When we look at the survival curves for the multiCAFE experiments (**Figure 17C and Figure 25**), we can see that at the same concentration, depending on the molecule, the flies do not live the same time. Moreover, we notice that there is an hormetic phenomenon present in the solid medium experiment that was not in the multiCAFE's ones (**Table 2**), only quinine present this characteristic at 0.1mM. Quinine has consistently at least one concentration where the flies live longer than the controls.

		Agar	MultiCAFE	Injections			Agar	MultiCAFE	Injections
Berberine	0.001mM	Orange	Orange		Escin	0.001mM	Orange	Orange	
	0.01mM	Orange	Orange			0.01mM	Orange	Orange	
	0.1mM	Orange	Orange			0.1mM	Orange	Orange	Green
	1mM	Orange	Orange	Orange		0.5mM	Orange	Orange	Orange
	5mM			Orange		1mM			Orange
	10mM			Orange		3mM			Orange
	15mM			Orange		5mM			Orange
Caffeine	0.001mM	Orange	Orange		Nicotine	0.001mM	Green	Orange	
	0.01mM	Orange	Orange			0.01mM	Green	Orange	
	0.1mM	Orange	Orange			0.1mM	Green	Orange	
	1mM	Orange	Orange	Orange		1mM	Orange	Orange	
	10mM			Orange		10mM			Green
	30mM			Orange		30mM			Green
	50mM			Orange		40mM			Orange
	100mM			Orange		50mM			Orange
150mM			Orange	100mM			Orange		
Denatonium	0.001mM	Green	Orange		Paraquat	0.001mM	Green	Orange	
	0.01mM	Orange	Orange			0.01mM	Green	Orange	
	0.1mM	Orange	Orange			0.1mM	Green	Orange	Green
	1mM	Orange	Orange	Orange		0.5mM	Orange	Orange	Orange
	3mM			Orange		1mM			Orange
	5mM			Orange		3mM			Orange
	10mM			Orange		5mM			Orange
30mM			Orange						
				Quinine	0.001mM	Orange	Orange		
					0.01mM	Green	Orange		
					0.1mM	Orange	Green		
					1mM	Orange	Orange	Orange	
					10mM			Green	
					30mM			Orange	
					50mM			Orange	
				100mM			Orange		
				150mM			Orange		

Table 2 Hormetic effect

We determined the hormetic effect of our bitter compounds in the 3 sets of experiments. "Agar" is the consumption on solid bitter food, "multiCAFE" is the consumption on liquid bitter food and "Injections" is following the injections. An orange spot means that there is no hormetic effect, meaning that when the flies are in contact with the toxin, they do not live longer than the control. A green spot means that there is an hormetic effect. A white spot is when the concentration was not tested.

## One method to evaluate the toxicity equal one unique ranking of lethal concentrations

In order to determine the toxicity of the different compounds, we used the lethal concentration 50 (LC50), which is the concentration needed to have 50 percent of death after 3 days. We chose 3 days because we noticed in the injection experiments, for several compounds, a first phase of decrease in survival which peaks around day 3, a phase correlated as the acute response to the toxicity of the injection. The second phase is considered to be weak post-ingestive mortality or natural mortality in the device.

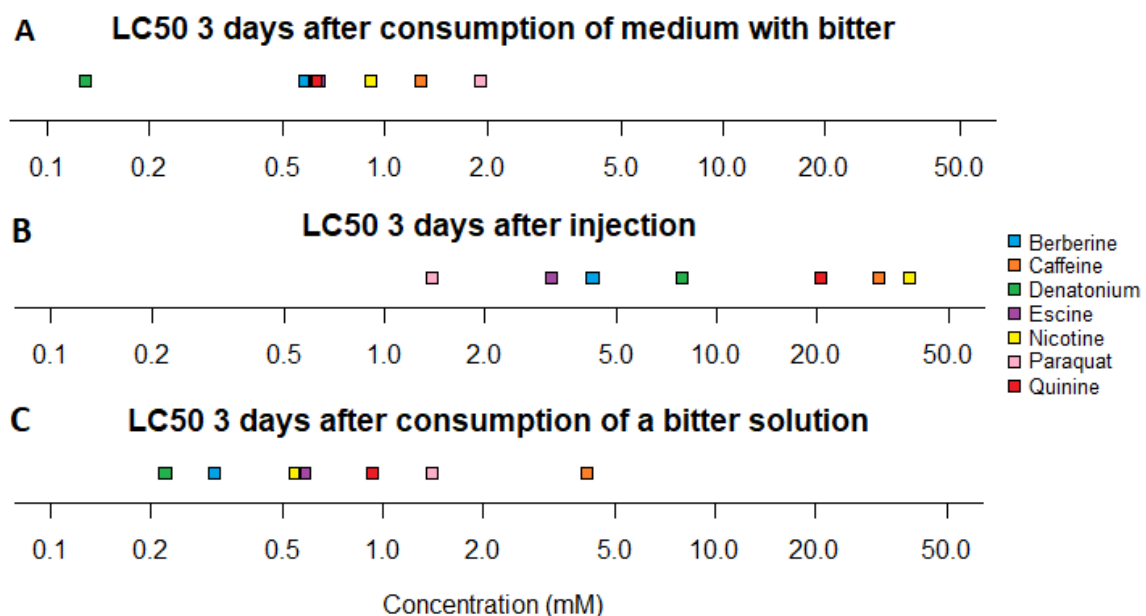


Figure 18: Lethal concentration 50 (LC50)

Each dot is the concentration needed to have 50% of the fly dead in 3 days when (A) they individually feed on a medium made of 1% agar, sucrose 30mM and a bitter compound, when (B) they are injected in the abdomen with 50nl of bitter compound and then put in an individual tube with a medium made of 1% agar, sucrose 30mM or (C) they feed on the multiCAFE device. They have access to 2 capillaries filled with the same solution of sucrose 30mM mixed with a bitter compound. Their individual survival is monitored with the camera attached to the multiCAFE device.

When the flies are feeding on a solid medium where the sucrose and bitter are mixed, we observe that denatonium benzoate is the least toxic compound whereas paraquat is the most toxic. However, for the 5 other compounds, the LC50 were quite close to each other, ranging from 0.5mM to 1.5mM (**Figure 18A**).

In the injections experiment, paraquat is the most toxic compound and nicotine is the least toxic after three days (**Figure 18B**). When we compared the LC50 values for the medium and



injection experiments. What we see is that each LC50 in the medium experiment is lower, which means that the compounds have to be at a lower concentration in order to infer the death of half the flies (**Figure 18A-B**). This result may be the consequence of the fact that we cannot separate the bitterness from the toxicity in the feeding experiment and perhaps the bitterness overpowers the toxicity regarding the survival of the flies. Moreover, when we look at the ranking of the compounds on the LC50 scale, we see that they are not in the same order. Paraquat which is the most toxic when injected, was the least toxic when consumed. Denatonium is the most toxic when consumed but in the middle of the ranking for injections. For the lethal concentration determination in the multiCAFE experiment, the LC50 obtained ranking is once again a little bit different from the one already obtained for the experiments two other experiments (**Figure 18**). There is still a little bit of change between the scales for the multiCAFE and the solid medium. However, the range of concentration is the same which means that there is a big bitter detection component to the survival of the flies.

### **Separating the toxicity from the bitterness of the compounds**

The great advantage of our multiCAFE device is that we are able to follow the individual consumption of the flies over a long period of time (**Figure 19A**). The detection is not linear and we can see that at the end of its life, the fly ate less than at the beginning. Moreover, in other analysis, we will look at the overall consumption of a group of flies for a certain concentration of a compound. Because some flies live longer than other, they consume more, so the average consumption decrease the volume ingested of the longer-living flies but increase the one of the short-living flies.

Moreover, we are able to compare the average consumption per fly over the duration of the experiment (**Figure 19B**). We observed that the longer the flies live, the more they consume of the solution that is presented to them. This result leads us to think that the quantity of toxic molecule ingested might not be as important as we thought.

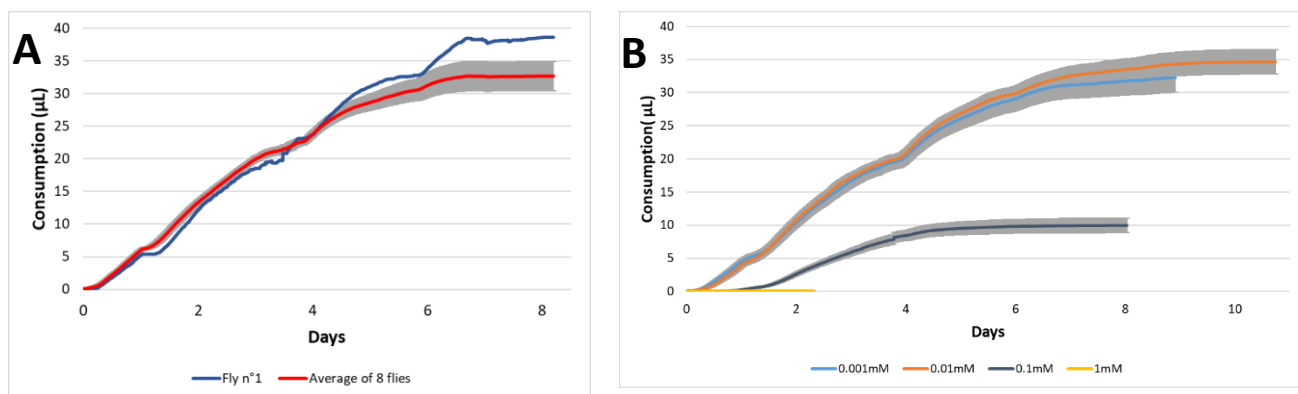


Figure 19: Consumption of denatonium by flies

(A) Consumption of a solution of 0.001mM of denatonium benzoate and 30mM of sucrose, by the fly n°1 (blue), until its death, in a group of 8 flies and the average consumption of said group (orange). (B) Cumulative curves of the average consumption by flies of a solution of denatonium benzoate and 30mM of sucrose. The SEM is represented in grey.

### The amount of sucrose is more important than the quantity of bitter molecules

When we look at the amount of toxic molecule ingested (consumption \* concentration = quantity), we can see that for the lower concentrations, a higher quantity of toxin does not mean a faster death (**Figure 20**). The flies consume roughly the same amount and die at about the same time, but we have a factor of 10 between each concentration which does not seem to affect either the survival or the consumption. The most telling example is for caffeine (**Figure 20B**) where some flies that are fed with a concentration of 1mM of compound live as long as the some fed with 0.1, 0.01 or 0.001mM, but the quantity of toxin can be up to 40 times more.

Moreover, when we look at the distribution of the flies feeding on 1mM, except for berberine and denatonium benzoate, we see that the flies that live the longer are also the ones that consume the most toxin which is equivalent to a larger volume of solution ingested. With aspect makes us think that the quantity of toxin may not be a limiting factor, the consumption of sucrose might be more important.

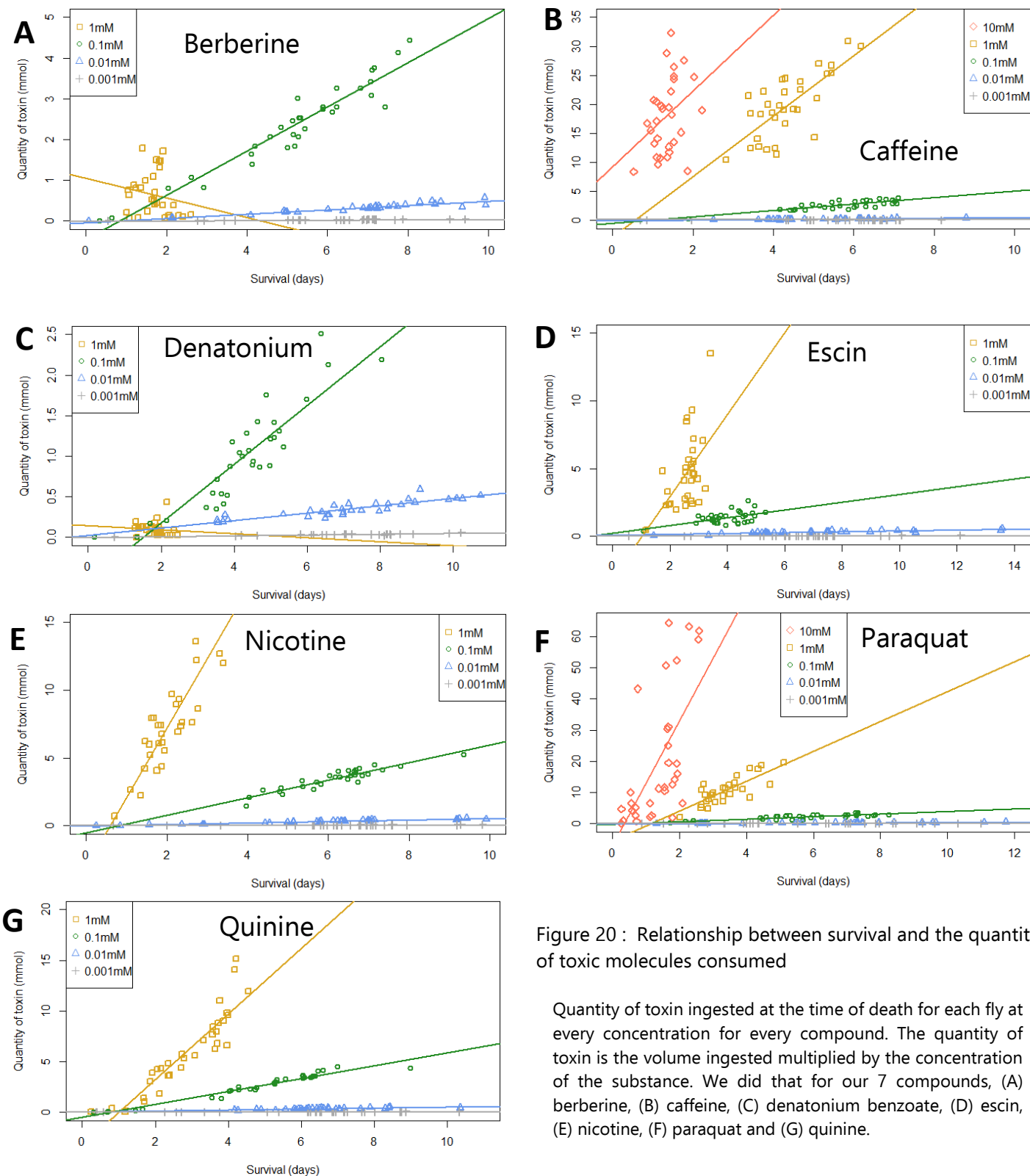


Figure 20 : Relationship between survival and the quantity of toxic molecules consumed

Quantity of toxin ingested at the time of death for each fly at every concentration for every compound. The quantity of toxin is the volume ingested multiplied by the concentration of the substance. We did that for our 7 compounds, (A) berberine, (B) caffeine, (C) denatonium benzoate, (D) escin, (E) nicotine, (F) paraquat and (G) quinine.

### The amount of sucrose is more important than the quantity of bitter molecules

When we look at the quantity of sucrose ingested mixed with the different concentrations of bitter compounds, we can see that, the correlation curves between the survival and the

quantity are parallel and even superposed between them for every compound (**Figure 21**). This observation confirms that the flies are trying to reach a quantity of sucrose rather than being put off by the toxin. However, at 1mM of berberine and denatonium (**Figure 21A and C**) and 10mM of caffeine and paraquat (**Figure 21B and F**), the bitter sensation seems to take over and the flies die because they do not eat.

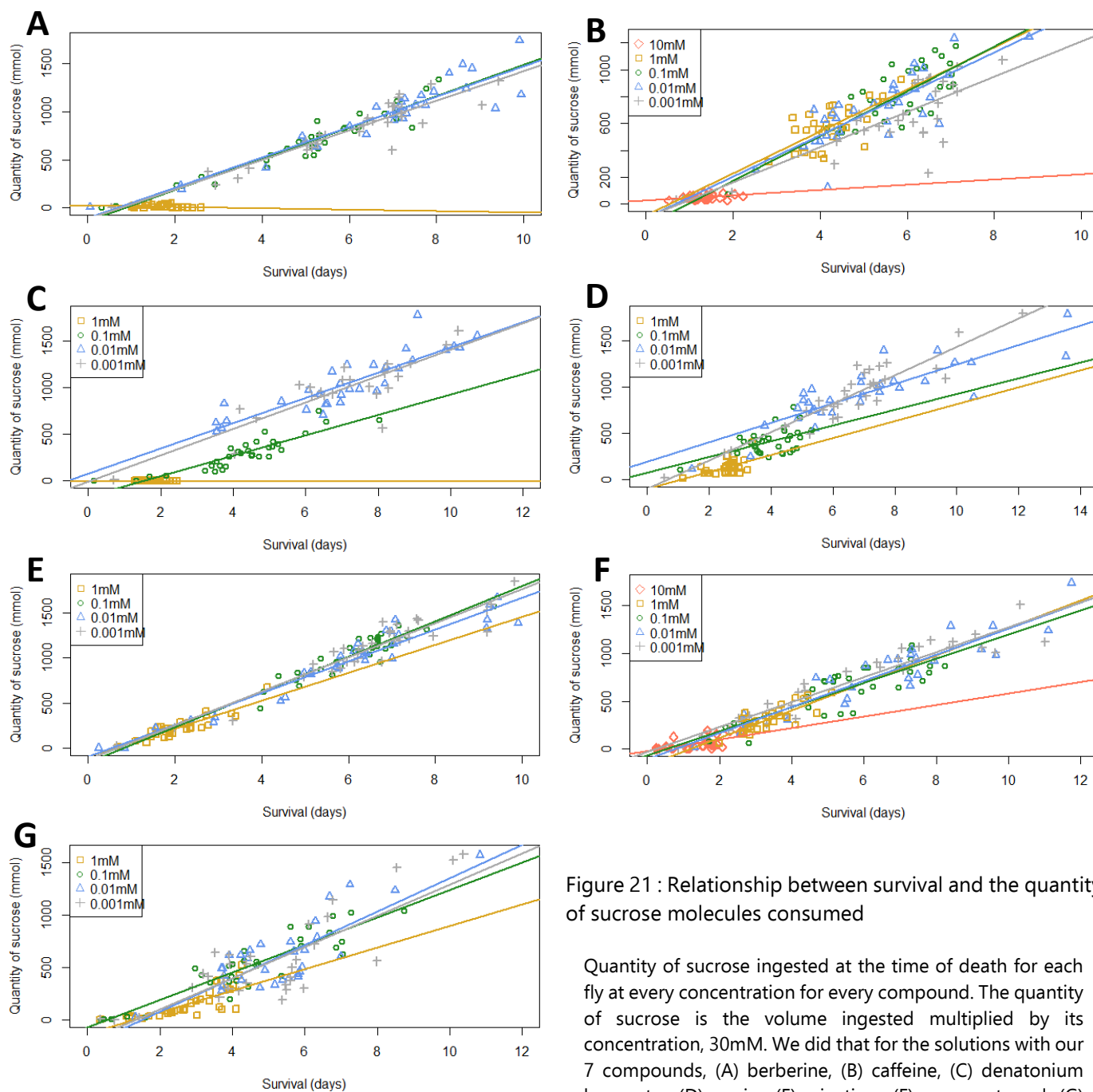


Figure 21 : Relationship between survival and the quantity of sucrose molecules consumed

Quantity of sucrose ingested at the time of death for each fly at every concentration for every compound. The quantity of sucrose is the volume ingested multiplied by its concentration, 30mM. We did that for the solutions with our 7 compounds, (A) berberine, (B) caffeine, (C) denatonium benzoate, (D) escin, (E) nicotine, (F) paraquat and (G) quinine.

## Is there a correlation between toxicity and bitterness?

In order to compare the “pure” toxicity represented by the injection, and the bitterness, represented by the blended bitter and toxicity of the long-term multiCAFE, we plot the two measurements of LC50 for every compound (Error! Reference source not found.). We observe that only the paraquat has the same LC50 in both cases, which means that it is as toxic in both settings. All the other compounds are below the  $x=y$  axis, which means that the LC50 of the multiCAFE experiment is stronger. Because the concentration needed to have 50% of death is lower in the multiCAFE experiment, it leads us to believe that the bitterness plays a larger part than previously thought in these experiments.

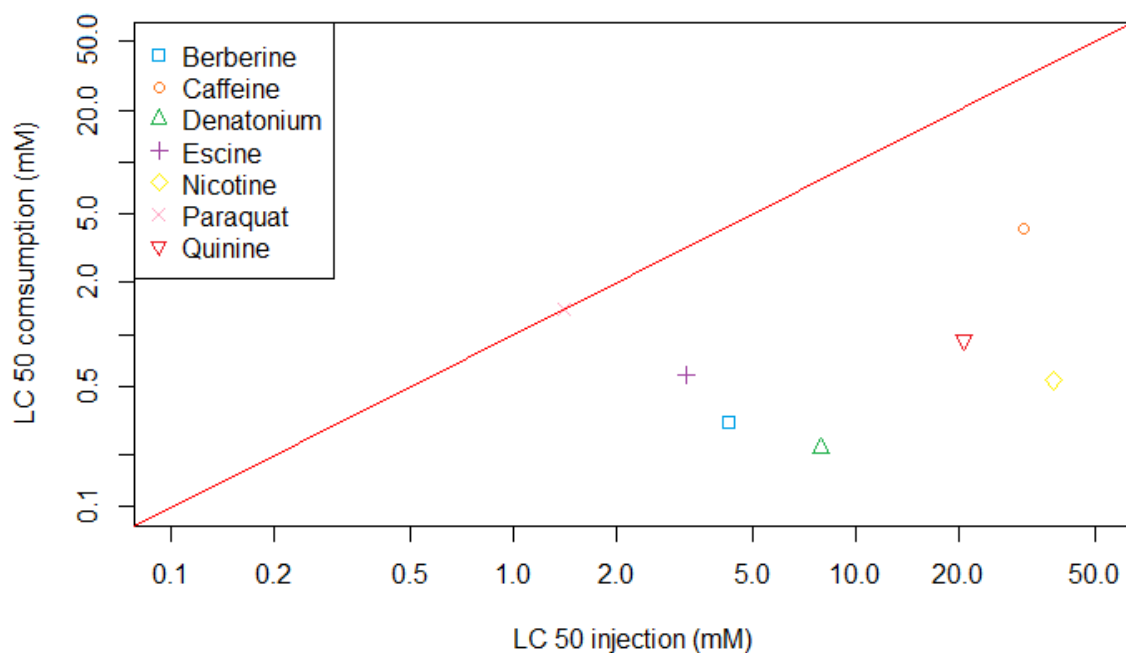


Figure 22 : Correlation between toxicity and bitterness

The red line represents  $x=y$ . If a compound is below the line, it means that the molecule is more toxic when consumed than injected. And when it's above the line, it means that the compound is more toxic when injected than consumed. Here, the only neutral compound is paraquat which is as toxic whether it's injected or consumed.

The first barrier of detection is in the mouth and we can see from these results that when the bitterness is too strong, the toxicity of a bitter molecule is not as important. Moreover, the quantities of compound are so low compare to the one of sucrose that it does not seem to affect the flies' survival.

#### 4. CONCLUSION/DISCUSSION

Here, we evaluated the correlation between bitterness and toxicity of seven molecules, known to be perceived as bitter by the fly *Drosophila melanogaster*. We estimated the toxicity by measuring the lifespan of animal exposed to different concentrations of the test compounds. We monitored the survival of flies in different experimental situations in order to gain multiple information.

To start with, we mixed bitter compounds with the food and followed the survival of the flies to determine the toxicity of the compounds. We observed that at high concentrations of bitter compounds, the flies died as quickly as when there was no nutritive sugar in the medium. At lower concentrations although, their lifespan was normal compared to the sucrose controls, under conditions they even tended to outlive the control. The hormesis phenomenon has already been documented in *Drosophila* in heat treatment (Hercus *et al.* 2003; Sorensen *et al.* 2008) and in food restriction (Magwere *et al.* 2004) amongst other parameters. However, no bitter compound was ever known to have this effect on flies.

Even though this experiment allows us to have interesting results, the problem is that the bitter taste and the toxicity cannot be distinguished and we are not able to determine if flies die because of one of these two parameters. In the literature, several methods, in insects, have been used to mimic ingestion of a compound without the need for the insect to actually eat it. In 1987, Cottee experimented with cannula in the abdomen of different locust's species (Cottee *et al.* 1988). The other main method is the injection, it has been done in several insects, from honeybees (Barron *et al.* 2007; Hurst *et al.* 2014) to flies (Dimitrijevic *et al.* 2004) and it was the one that we thought was the best for our experiments.

We injected our bitter compounds in the flies' abdomen. From the activity analysis, a toxicity scale of the different tested compounds was determined. The only downside to the injection is that defense mechanisms can be bypassed, like crop (Lemaitre and Miguel-Aliaga 2013; Stoffolano and Haselton 2013) which can give a signal to regurgitate the food if it's perceived as toxic. Moreover, some detoxification mechanisms might not have the time to play their part with an injection rather than a slow natural ingestion of food.

Usually when it comes to bitter molecules, they are not studied by injection but by ingestion, which is why we have chosen to perform an ingestion assay where we are able to quantify the amount of food eaten by the flies. To do so we modified the CAFE assay developed by Ja (*Ja et al.* 2007) in order to have data for individual flies feeding on multiple capillaries and their survival. Moreover, it is the first time that a study shows the consumption of flies over a long period of time.

At high doses of bitter compounds, we have the confirmation of our previous hypothesis that the flies die because they do not eat, which means that the bitter taste takes over the toxicity. These concentrations, 1mM and 10mM, are not the one that are the most interesting to us because of they do not represent post-digestive toxicity. What we can see is that there is an adaption over time of the flies to the different bitter molecules when the concentration is low. The longer the flies live the more they eat, which means that the toxins do not seem to have a relevant impact on the consumption and it is rather the sugar that seems to be predominant. The accepted dogma is that sweet perception is here to help animals to detect sources of glucose. But, sweet molecules interact with a lot of other molecules and it changes their taste perception, bitter being a major one (Keast and Breslin 2002; Beauchamp 2016).

The correlation plot between the toxicity in the multiCAFE experiment and the injections does not show a significant correlation between these two experiments except for paraquat. Two hypotheses occur. First, paraquat at the used concentrations is not bitter enough to impede on the feeding. Although these are the same concentrations used for each compound and at 10mM the flies feeding on paraquat die at the same rate as when fed only on water, which means that the bitterness is high. Second, paraquat is the only molecule among the seven tested compounds, where bitterness and toxicity are really linked.

The correlation between the threshold of detection and the threshold of toxicity seems inexistent in mammals (Glendinning 1994), and the study of bitter compounds in insects showed that bitterness is not a good signal for toxicity (*Cottee et al.* 1988; Bernays 1990; Wrubel and Bernays 1990b; Bernays and Cornelius 1992; Aerts and Mordue 1997; Glendinning 2002). Bernays suggested that aversive behavioral responses was more the result of other selection pressures than post-ingestion toxicity (Bernays 1990). Other authors proposed that the absence of clear link between these parameters reflected the physiological constraints of

the nervous system in front of the great diversity of structures of the bitter and toxic compounds (Glendinning 1994). The recognition of the host plant (and the avoidance of the non-host plants) might explain the enhanced sensitivity of specialist insects compared to generalist insects to bitter compounds that are not derived from their usual host (Bernays and Cornelius 1992).

In this study we are not able to make the connection between bitterness and toxicity in *Drosophila melanogaster* for the compounds that we selected. Our main problem is that we cannot separate bitter from toxicity. Which is why the next step would be to mask the bitter taste by multiple technics (Gaudette and Pickering 2013; Al-kasmi *et al.* 2017), cyclodextrins (Konno *et al.* 1982; Szejtli and Szente 2005) is a good way or emulsions.



## 5. SUPPLEMENTARY FIGURES

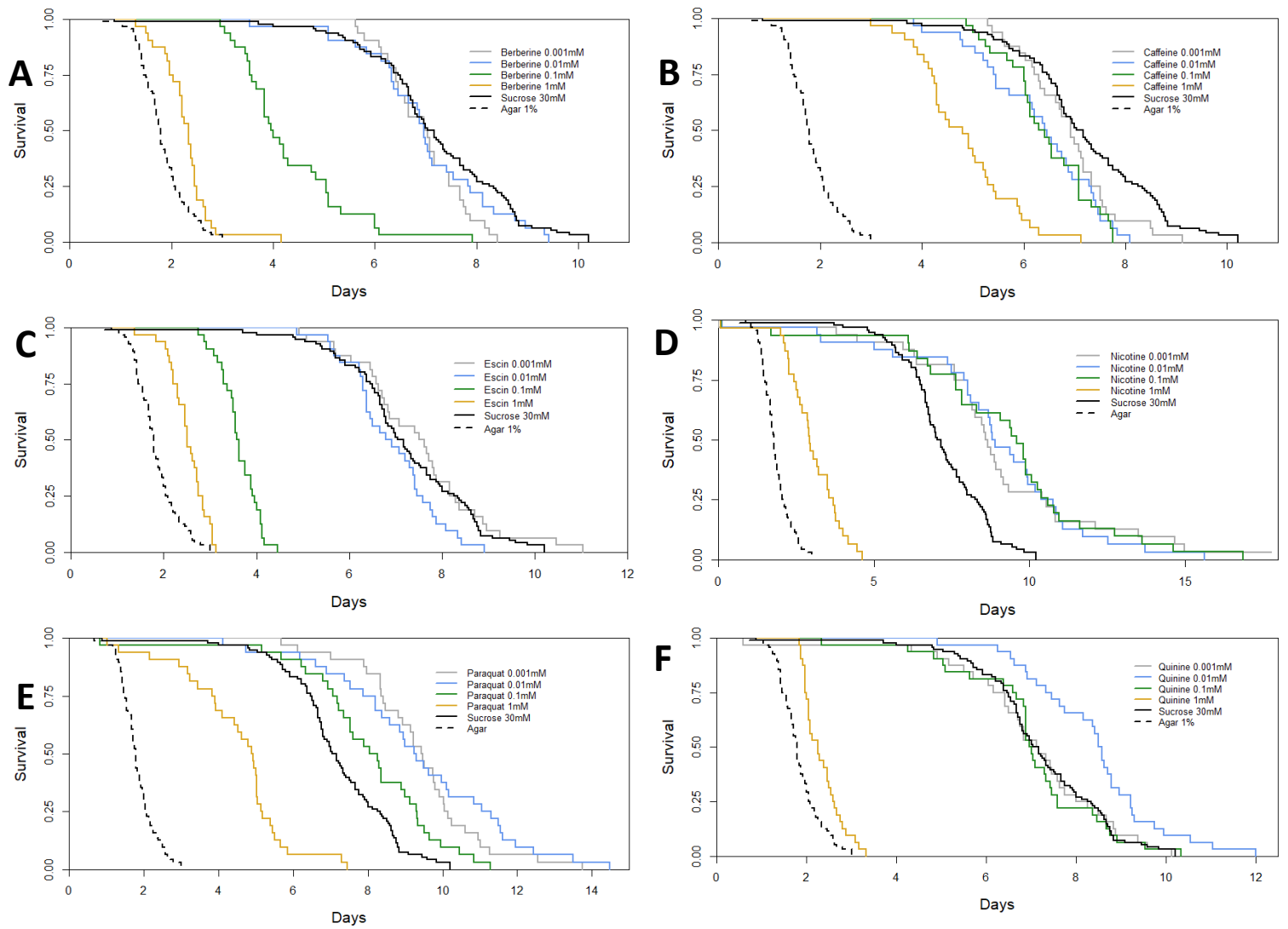


Figure 23 : Survival over time when flies are fed on an agar, sucrose and bitter solide medium

Survival curves of the flies put on an agar (1%), sucrose (30mM) and bitter medium in a tube placed in an activity monitor which allowed us to know precisely their time of death. We tested different molecule, (A) berberine, (B) caffeine, (C) escin, (D) nicotine, (E) paraquat and (F) quinine

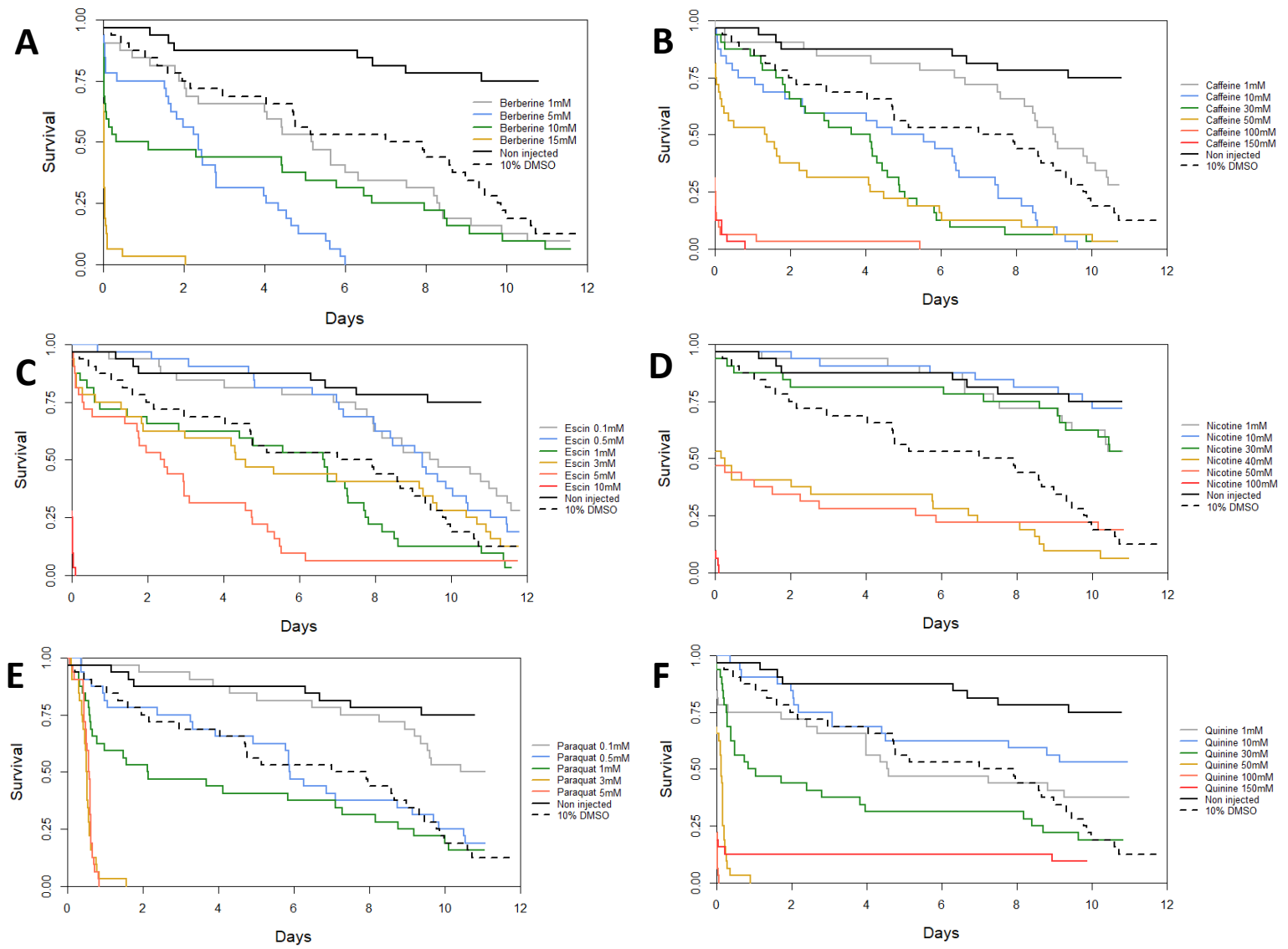


Figure 24 : Survival over time after injection of bitter molecules

Survival curves of the flies after an injection of 50nL of a bitter solution. The flies are put on an agar (1%) and sucrose (30mM) in a tube placed in an activity monitor which allowed us to know precisely their time of death. We tested different molecule, (A) berberine, (B) caffeine, (C) escin, (D) nicotine, (E) paraquat and (F) quinine.

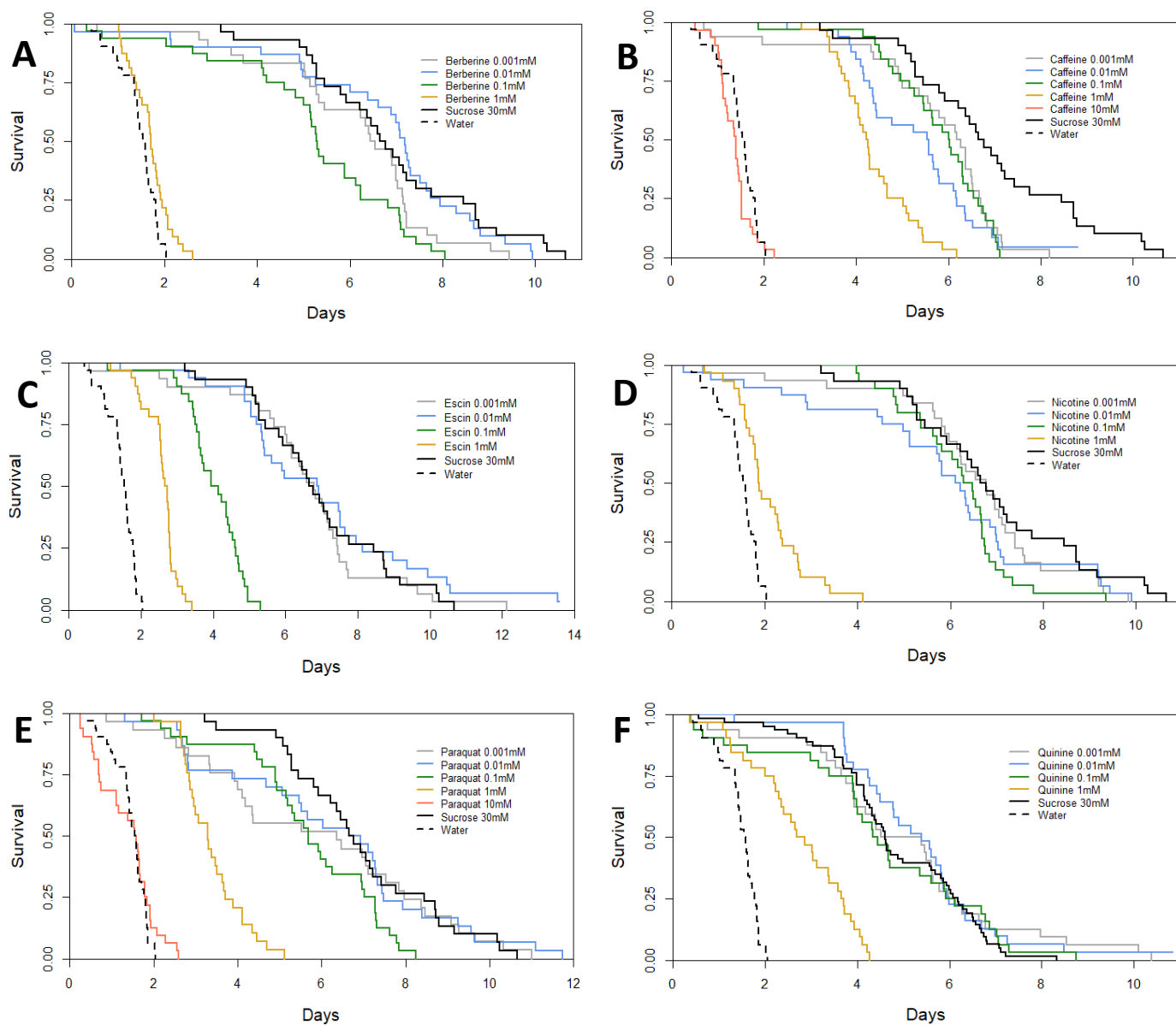


Figure 25 : Survival over time when flies are fed on liquid medium in the multiCAFE device

Survival curves of the flies feeding on the two capillaries filled with the same solution of sucrose 30mM and bitter at different concentration. The activity tracking of the flies allowed us to know precisely their time of death. We tested different molecule, (A) berberine, (B) caffeine, (C) escin, (D) nicotine, (E) paraquat and (F) quinine.

## 6. REFERENCES

- Adler, E., M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. P. Ryba and C. S. Zuker (2000). "A novel family of mammalian taste receptors." Cell **100**(6): 693-702.
- Aerts, R. J. and A. J. Mordue (1997). "Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids." Journal of Chemical Ecology **23**(9): 2117-2132.
- Al-kasmi, B., M. Alsirawan, M. Bashimam and H. El-zein (2017). "Mechanical microencapsulation: The best technique in taste masking for the manufacturing scale - Effect of polymer encapsulation on drug targeting." Journal of Controlled Release **260**: 134-141.
- Barron, A. B., J. Maleszka, R. K. Vander Meer, G. E. Robinson and R. Maleszka (2007). "Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine." Journal of Insect Physiology **53**(2): 187-194.
- Beauchamp, G. K. (2016). "Why do we like sweet taste: A bitter tale?" Physiology & Behavior **164**: 432-437.
- Behrens, M. and W. Meyerhof (2006). "Bitter taste receptors and human bitter taste perception." Cellular and Molecular Life Sciences **63**(13): 1501-1509.
- Bergvall, U. A. and O. Leimar (2005). "Plant Secondary Compounds and the Frequency of Food Types Affect Food Choice by Mammalian Herbivores." Ecology **86**(9): 2450-2460.
- Bernays, E. A. (1990). "Plant secondary compounds deterrent but not toxic to the grass specialist acridid *Locusta migratoria*: Implications for the evolution of graminivory." Entomologia Experimentalis et Applicata **54**(1): 53-56.
- Bernays, E. A. and R. F. Chapman (2000). "A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths." Journal of Insect Physiology **46**(6): 905-912.
- Bernays, E. A. and M. Cornelius (1992). "Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the alfalfa weevil *Hypera brunneipennis*." Entomologia Experimentalis et Applicata **64**(3): 289-292.
- Bernays, E. A., S. Oppenheim, R. F. Chapman, H. Kwon and F. Gould (2000). "Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars." Journal of Chemical Ecology **26**(2): 547-563.
- Chen, Y. C. D., S. J. Park, R. M. Joseph, W. W. Ja and A. A. Dahanukar (2019). "Combinatorial pharyngeal taste coding for feeding avoidance in adult *Drosophila*." Cell Reports **29**(4): 961-973.
- Clyne, P. J., C. G. Warr and J. R. Carlson (2000). "Candidate taste receptors in *Drosophila*." Science **287**(5459): 1830-1834.
- Cottee, P. K., E. A. Bernays and A. J. Mordue (1988). "Comparisons of deterrence and toxicity of selected secondary plant compounds to an oligophagous and a polyphagous acridid." Entomologia Experimentalis Et Applicata **46**(3): 241-247.
- David, J. R. (1962). "A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions." Drosophila Information Service **36**: 128.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour and J. C. Olivo-Marin (2012).

- "Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research." Nature Methods **9**(7): 690-696.
- Dimitrijevic, N., S. Dzitoyeva and H. Manev (2004). "An automated assay of the behavioral effects of cocaine injections in adult *Drosophila*." Journal of Neuroscience Methods **137**(2): 181-184.
- El-Keredy, A., M. Schleyer, C. Konig, A. Ekim and B. Gerber (2012). "Behavioural analyses of quinine processing in choice, feeding and learning of larval *Drosophila*." PLoS ONE **7**(7).
- Gaudette, N. J. and G. J. Pickering (2013). "Modifying bitterness in functional food systems." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **53**(5): 464-481.
- Glendinning, J. I. (1994). "Is the bitter rejection response always adaptive?" Physiology & Behavior **56**(6): 1217-1227.
- Glendinning, J. I. (2002). "How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet?" Entomologia Experimentalis et Applicata **104**(1): 15-25.
- Glendinning, J. I., S. Domdom and E. Long (2001). "Selective adaptation to noxious foods by a herbivorous insect." Journal of Experimental Biology **204**(19): 3355-3367.
- Hercus, M. J., V. Loeschcke and S. I. S. Rattan (2003). "Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress." Biogerontology **4**(3).
- Hurst, V., P. C. Stevenson and G. A. Wright (2014). "Toxins induce 'malaise' behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*)." Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology **200**(10): 881-890.
- Ibanez, S., C. Gallet and L. Despres (2012). "Plant insecticidal toxins in ecological networks." Toxins **4**(4): 228-243.
- Ja, W. W., G. B. Carvalho, E. M. Mak, N. N. de la Rosa, A. Y. Fang, J. C. Liang, T. Brummel and S. Benzer (2007). "Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(20): 8253-8256.
- Jacobs, W. W. B. G. K. K., M. R. (1978). "Progress in Animal Flavor Research." Flavor Chemistry of Animal Foods **67**: 1-20.
- Keast, S. J. R. and P. A. S. Breslin (2002). "An overview of binary taste-taste interactions." Food Quality and Preference **14**(2): 111-124.
- Konno, A., M. Misaki, J. Toda, T. Wada and K. Y. Asumatsu (1982). "Bitterness Reduction of Naringin and Limonin by B-Cyclodextrin." Agricultural and Biological Chemistry **46**(9): 2203-2208.
- Lemaitre, B. and I. Miguel-Aliaga (2013). "The digestive tract of *Drosophila melanogaster*." Annual Review of Genetics **47**: 377-404.
- Li, X. D., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller and E. Adler (2002). "Human receptors for sweet and umami taste." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(7): 4692-4696.
- Liman, E. R., Y. V. Zhang and C. Montell (2014). "Peripheral coding of taste." Neuron **81**(5): 984-1000.
- Magwere, T., T. Chapman and L. Partridge (2004). "Sex Differences in the Effect of Dietary Restriction on Life Span and Mortality Rates in Female and Male *Drosophila Melanogaster*." Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES **59**(1): 3-9.
- Meunier, N., F. Marion-Poll, J. P. Rospars and T. Tanimura (2003). "Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*." Journal of Neurobiology **56**(2): 139-152.

- Mitchell, B. K., H. Itagaki and M. P. Rivet (1999). "Peripheral and central structures involved in insect gustation." Microscopy Research and Technique **47**(6): 401-415.
- Montell, C. (2009). "A taste of the *Drosophila* gustatory receptors." Current Opinion in Neurobiology **19**(4): 345-353.
- Moon, S. J., M. Kottgen, Y. C. Jiao, H. Xu and C. Montell (2006). "A taste receptor required for the caffeine response *in vivo*." Current Biology **16**(18): 1812-1817.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. X. Feng, G. Zhao, N. J. P. Ryba and C. S. Zuker (2002). "An amino acid taste receptor." Nature **416**(6877): 199-202.
- Nishida, R. and H. Fukami (1990). "Sequestration of distasteful compounds by some pharmacophagous insects." Journal of Chemical Ecology **16**(1): 151-164.
- Pacheco, A. G. and M. D. Rebelo (2013). "A simple R-based function to estimate lethal concentrations." Marine Environmental Research **91**: 41-44.
- Rich, J. T., J. G. Neely, R. C. Paniello, C. C. J. Voelker, B. Nussenbaum and E. W. Wang (2010). "A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves." Otolaryngology-Head and Neck Surgery **143**(3): 331-336.
- Scott, K. (2005). "Taste recognition: Food for thought." Neuron **48**(3): 455-464.
- Sellier, M.-J., P. Reeb and F. Marion-Poll (2011). "Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions." Chemical Senses **36**(4): 323-334.
- Simpson, S. J. and D. Raubenheimer (1996). "Feeding behaviour, sensory physiology and nutrient feedback: A unifying model." Entomologia Experimentalis et Applicata **80**(1): 55-64.
- Sorensen, J. G., P. Sarup, T. N. Kristensen and V. Loeschcke (2008). "Temperature-Induced Hormesis in *Drosophila*." Mild Stress and Healthy Aging: 65-79.
- Stocker, R. F. (1994). "The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster* - a review." Cell and Tissue Research **275**(1): 3-26.
- Stoffolano, J. G., Jr. and A. T. Haselton (2013). "The adult Dipteran crop: a unique and overlooked organ." Annual Review of Entomology **58**: 205-225.
- Szejtli, J. and L. Szente (2005). "Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **61**(3): 115-125.
- Tanimura, T., K. Isono, T. Takamura and I. Shimada (1982). "Genetic dimorphism in the taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*." Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology **147**(4): 433-437.
- Weiss, L. A., A. Dahanukar, J. Y. Kwon, D. Banerjee and J. R. Carlson (2011). "The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*." Neuron **69**(2): 258-272.
- Wrubel, R. P. and E. A. Bernays (1990). "The relative insensitivity of *Manduca sexta* larvae to non-host plant secondary compounds." Entomologia Experimentalis et Applicata **54**(2): 117-124.
- Zhang, Y. V., R. P. Raghuwanshi, W. L. Shen and C. Montell (2013). "Food experience-induced taste desensitization modulated by the *Drosophila* TRPL channel." Nature Neuroscience **16**(10): 1468-1476.
- Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2003). "The receptors for mammalian sweet and umami taste." Cell **115**(3): 255-266.



# Chapitre 3





# CHAPITRE 3 : MASQUAGE DU GOUT

## AMER

---

Ce que le chapitre précédent nous montre, est qu'il est très compliqué de réussir à séparer l'amertume de la toxicité pour pouvoir les tester indépendamment dans des conditions naturelles. C'est pourquoi nous avons opté pour essayer de masquer l'amertume d'une molécule.

Bien que les molécules que nous ayons testées précédemment sont toxiques, ici nous nous intéressons à l'oleuropéine qui est le composé phénolique responsable de l'amertume de l'huile d'olive.

Nous allons évaluer les étapes préalables de la formulation de nano-émulsions dans le but de voir si les composants présents ne sont pas répulsifs pour les drosophiles. Nous évaluerons l'intérêt de la  $\beta$ -lactoglobuline qui est une molécule utilisée comme tensioactif. Elle se place à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse et permet de stabiliser l'émulsion.

J'ai effectué ces travaux à l'Institut Galien, à Châtenay-Malabry, sous la direction de Ghazlene Mekhloufi.

# Characterization of the detection of oleuropein and its concealment by $\beta$ -lactoglobulin for *Drosophila melanogaster*

Perrine Colombi<sup>a</sup>, Frédéric Marion-Poll<sup>a,b</sup>, Ghazlene Mekhloufi<sup>c</sup>

(a) UMR Evolution, Génomes, Comportement, Ecologie, CNRS-IRD-Univ. Paris-Saclay, Université Paris Saclay, Campus CNRS, Bâtiment 13, BPI – 91198 Gif-sur-Yvette – France

(b) AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris – France

(c) Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

## Summary

Bitterness is a gustatory quality inducing food rejection in most animals and humans, as it is a warning for the presence in the food of potentially toxic compounds. There are a number of situations where it would be advantageous to find ways to mask this bitter taste, either because specific bitter compounds should be ingested for health benefits or for medical reasons.

Here, we looked at oleuropein which is a phenolic compound of olive oil that has a wide range of health benefits. We examined the first step of a nano-formulation of oleuropein using  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ lg). As a test organism, we used *Drosophila melanogaster* fed with or without  $\beta$ lg, in order to see if  $\beta$ lg can decrease the bitter taste of oleuropein.

At the lowest concentrations, we are able to see an increase of consumption when  $\beta$ lg is present in the solution. However, this effect might only be because  $\beta$ lg mixed with sucrose is more appetitive for the flies.

## 1. INTRODUCTION

Pharmaceutical and food industries have an interest in working on masking the bitter taste of molecules. Bitterness is generally considered as a signal of potentially noxious food, inducing a general rejection of food in most organisms. However, a number of molecules used in pharmacy or present in the food, either from plants or lactate products, are detected by the gustatory system as bitter, thus preventing their ingestion. While education and food consumption habits may reduce this natural aversion, this is generally not enough to promote the consumption of useful bitter molecules, especially in young adults. Pharmaceutical industry aims to decrease or to completely eliminate the bitter taste of some active ingredients with the objective to improve medication intake and patient compliance. Food industry aims at decreasing the bitter taste of some healthy food, mainly in “functional foods” (Coupland and Hayes 2014).

The bitter taste can be concealed either by a physical approach or by a chemical approach (or organoleptic method), which allow different dynamic interactions, suppression or enhancement of the taste, and asymmetrical changes of intensity (Keast and Breslin 2002).

The chemical concealment of bitter taste consists in mixing another gustative compound (sugars, salts, sour) to a bitter solution in order to decrease the aversive potential. Sugars are one of the most efficient compounds to hinder bitter taste (Kamen *et al.* 1961; Schiffman *et al.* 1994). However, its action is driven by each sugar-bitter pair in the mixture, as they do not interact in the same manner. Salt, like NaCl, also has a strong power to reduce bitter taste (Breslin and Beauchamp 1995; 1997), whereas acid compounds have a complex relationship with bitter where the two tastes can easily enhance or decrease each-other taste potential (Breslin 1996).

Bitterness can also be masked by complexing the bitter molecules with cyclodextrins, by polymers coating, or by encapsulating them in microemulsions and emulsions (Coupland and Hayes 2014). One of these strategies is to use  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg), which is a globular protein extracted from bovine whey. It is composed of 162 amino acids with a secondary structure composed of 8 antiparallel  $\beta$ -sheets which form a hydrophobic central cavity, the calyx (Brownlow *et al.* 1997). This central calyx binding site can be occupied by hydrophobic

molecules. Several studies have shown that  $\beta$ lg can bind to small molecules with a poor water solubility (Al-Shabib *et al.* 2018; Dan *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019). The complex  $\beta$ lg/molecule is used as a delivery system to improve the poor bioavailability in a solution.

Here, we examined the suitability of this approach to mask the bitter taste of oleuropein (**Figure 26**). Oleuropein is one of the major polyphenolic compounds found in olive oil. It is responsible for the bitter taste found in unprocessed olives and is the most prevalent in olive leaves seed, pulp and peel of unripe olives (Sasha and Leibowitz 1961). Despite its bitter taste, oleuropein is proven to have a large panel of beneficial effects on human health (Barbaro *et al.* 2014). The main ones are antioxidant effects, anti-tumor and anti-inflammatory properties among a lot of others (de la Puerta *et al.* 1999; Paiva-Martins *et al.* 2011). A recent study showed that  $\beta$ lg is able to form a complex with oleuropein molecules and, as a result, it improved the solubility. However, it had an impact on the conformation and configuration of  $\beta$ lg (Vanaei *et al.* 2020).

In this paper, we used *Drosophila melanogaster* as a test organism and we were interested in masking the bitter taste of oleuropein by interaction with  $\beta$ -lactoglobulin. We monitored the consumption of oleuropein and oleuropein/ $\beta$ -lactoglobulin mixture at different oleuropein concentrations.

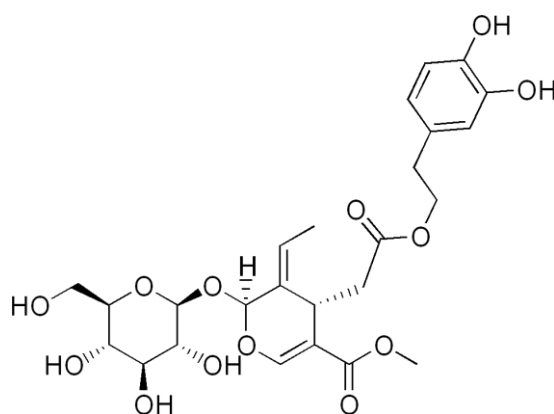


Figure 26 : Chemical structure of oleuropein

## 2. MATERIALS & METHODS

### **Drosophila stocks**

Flies (Canton S flies (Bloomington : BSC 64349)) were grown on David's axenic medium (David 1962): 12 g agar, 83 g dried yeast (LCS Whole Yeast 50, Lesaffre Culinary Strasbourg, France), 83 g roasted corn flour (farine de gaudes, Les graines du Père Pajo, France), 6.9 g nipagin (VWR, France; CAS No. 99-76-3), 50 mL ethanol for 1 L of water at 25°C, and 75% of humidity with a day:night cycle of 12:12. Emerged flies (~0-day old) were first sexed (after numbing them with CO<sub>2</sub>), then transferred to a freshly prepared axenic agar food medium for 3 days, and maintained in a rearing chamber at 25 °C.

### **Chemicals**

Most chemicals were supplied from Sigma Aldrich of the highest available purity: sucrose (Sigma-Aldrich, CAS No. 57-50-1, 99.5 % purity), erioglaucine (Sigma Aldrich, CAS No. 3844-45-9), β-lactoglobulin (≥ 90% purity, CAS no. 9045-23-2). Oleuropein was provided from Cayman (≥ 98%; CAS no. 32619-19-4).

All prepared solutions contained 30 mM sucrose and  $1.58 \times 10^{-2}$  mM of erioglaucine (blue dye) mixed with ultrapure water, unless noted otherwise. The solutions were prepared no longer than a week in advance and kept at 4-6 °C.

β-lactoglobulin (βlg) was dispersed under gentle stirring for 2 days in Phosphate Buffer (pH=7.0) at a final solution concentration of 1% (w/w). The protein solution was kept overnight at 4°C to achieve complete hydration of βlg. Next, the sucrose and erioglaucine solutions were added.

Oleuropein was solubilized in water containing the blue dye in order to have an oleuropein concentration varying from 0.001mM to 10mM.

### **Capillary feeding assay (multiCAFE)**

All experiments were performed at 25 °C with 65%-70% R.H. in constant light. 3 days old male flies were introduced into individual chambers and given *ad libitum* access to glass capillaries.

For the short-term experiments, the flies were starved for 20h, otherwise they came directly from the axenic medium.

We use the setup described in Colombi et al. (chapter 1), the glass capillaries have a volume of 5 $\mu$ L for short-term experiment (32 mm long; Hirschmann Laborgeräte, VWR, France) and 10 $\mu$ L for the long-term experiment (2 weeks). For this latter, and in order to allow the flies to always have access to food, we put an agar plug (0.5%) at the bottom of the capillaries. Capillaries were changed every 2 to 3 days and replaced with new ones filled with the same solutions.

### **MultiCAFE image capture and analyses**

Capillaries and flies were monitored with the help of webcams. At a resolution of 1280 x 720 pixels, each capillary (32 mm) was 300 to 400 pixels long and 5-8 pixels wide. The camera (Logitech HD Pro C920) was set to record 1 image per minute using a time-lapse capturing software (iSpy v 7.2.1.0; <http://iSpyConnect.com>). We could record simultaneously from 4 cameras on a regular PC computer under Windows 10, or from 16 cameras using 4 PCIe cards (PEXUSB3S44V, Startech).

The analysis the consumption of the stacks of pictures obtained with the multiCAFE setting is the same as in Colombi et al (chapter 1).

For the analyses of the survival, we followed the activity of the flies with a custom program, MultiCAFE (Marion-Poll 2020), as a plugin running under the image analysis platform ICY de Chaumont *et al.* (2012). If the position of the fly does not change from a certain number of pixels for 30 minutes, the fly is considered dead.

### **Preference index**

The preference index (PI) was calculated as follow:

$$PI = [(consumption\ of\ sucrose\ +\ compound) - (consumption\ of\ sucrose)] / (total\ consumption)]$$

PI values are between 1 and -1, 1 being the consumption of only the molecule of interest's solution and -1 being the consumption of only the sucrose solution.

In this paper, for the sake of convenience, we compare two PI to each other. Indeed, it is harder to compare the actual consumption of the flies that can be at different levels depending on its attractiveness or deterrence.

## **Nano-injections**

Flies are collected and sexed after emergence, at day 0, and put on axenic agar medium until day 3. At that time, they are placed in an empty tube and on ice to induce narcosis. We inject in the abdomen of 3 days old male flies 50nL of a solution containing bitter compounds at different concentrations using a nano-injector (Nanoject II Auto-Nanoliter Injector, Drummond Scientific). Females are discarded because (i) their sensitivity may change with their sexual state and (ii) in order to be able to compare our results with those of previous experiments done with males.

The injector is manually handled and the needle is kept inside of the abdomen until the whole volume is injected. The concentrations are adapted to the mortality of the flies, in order to obtain an appropriate range of dose-response curves. As controls, we have flies that had no treatment or flies that have only been poked with the needle but not injected with anything.

## **Flies survival**

For the different experiments performed with this device, each fly (n=32 per concentration) is put into a 6.5 cm (long) x 6 mm (diameter) transparent plastic straw closed at one end with a cotton plug and at the other end, 2 cm of food medium, either 1% agar with 30mM of sucrose for the flies following an injection. Each straw is then inserted into a locomotion detector (Trikinetics Inc, DAM2) to record the number of times the fly crossed the infrared beam over a period of 10 to 12 days. The recording devices are disposed in a rearing chamber at 25°C with a day: night cycle of 16:8, at constant humidity, the data are acquired every 5 minutes.

We perform control monitoring the time span of flies for the injection experiment not injected with anything but only punctured, or receiving no injection but only narcosis with the ice. The time of death of each individual is defined as the last interval of time at which a movement is detected. The statistical analysis is performed as described in the "Statistical analysis" section below.



## **Lethal concentration**

The lethal concentration 50 (LC50) is the concentration needed to have 50% of the fly dead after a time that we choose. Here, we chose 3 days because it is before that point that we observe post-ingestive effects.

The LC50 for each compound is obtained following an R function (Pacheco and Rebelo 2013).

## **Statistical analysis**

For the consumption, after all levels within the capillaries were detected, data were exported to Excel spreadsheet files as 2 consecutive rows for each fly, each row including textual descriptors pertaining to the experiment. Data were analyzed using R software (version 4.0.4). For every experiment, we compared the mean consumption in all capillaries. Wilcoxon test, paired, was used, when the flies were presented with 2 capillaries with different solutions in them. When the total consumptions were, we used Wilcoxon test, unpaired, was used.

For lifespan observations made either with the locomotion monitor or with monitoring movement in the multiCAFE cages, each individual was associated with its time of death and its status at the end of the experiment (dead or still alive). These data were used to compute an estimation of the survival curves with the Kaplan-Meier method (Rich *et al.* 2010). These curves were then compared two-by-two with a log-rank test (non-parametrical, adapted to survival data; [survdiff] in the toolset of the package "Survival" in R).

This presentation of the data gives an estimation of the survival with the Kaplan-Meier method (Rich *et al.* 2010), to generate the corresponding curves. These curves are then compared two-by-two with a log-rank test (non-parametrical, adapted to survival data; "survdiff" in the toolset of the package "Survival"). Other statistical tests are indicated with the data when used.

## **3. RESULTS**

### **Dose-response curve for oleuropein**

First, the bitter potential and the perception of oleuropein was evaluated on preliminary starved flies. The compound of interest mixed with sucrose was presented to these flies for a short-

term experiment (2 hours). Flies have access to two capillaries, one filled with sucrose at 30mM concentration, and the second one filled with a mixture of sucrose 30mM and oleuropein at concentrations; ranging from 0.001mM to 10mM. Results show that in all cases, flies consumed significantly more the sucrose solution than the mixture oleuropein+sucrose solution (**Figure 27**). Thus, they preferred the sucrose and probably detected some bitterness of oleuropein even at 0.001mM concentration. Moreover, flies made up for the decrease of consumption of oleuropein by eating more sucrose. For 10mM concentration of oleuropein, the consumption of oleuropein+sucrose mixture was nearly 7-fold less than that of sucrose solution, indicating that bitterness was highly detected.

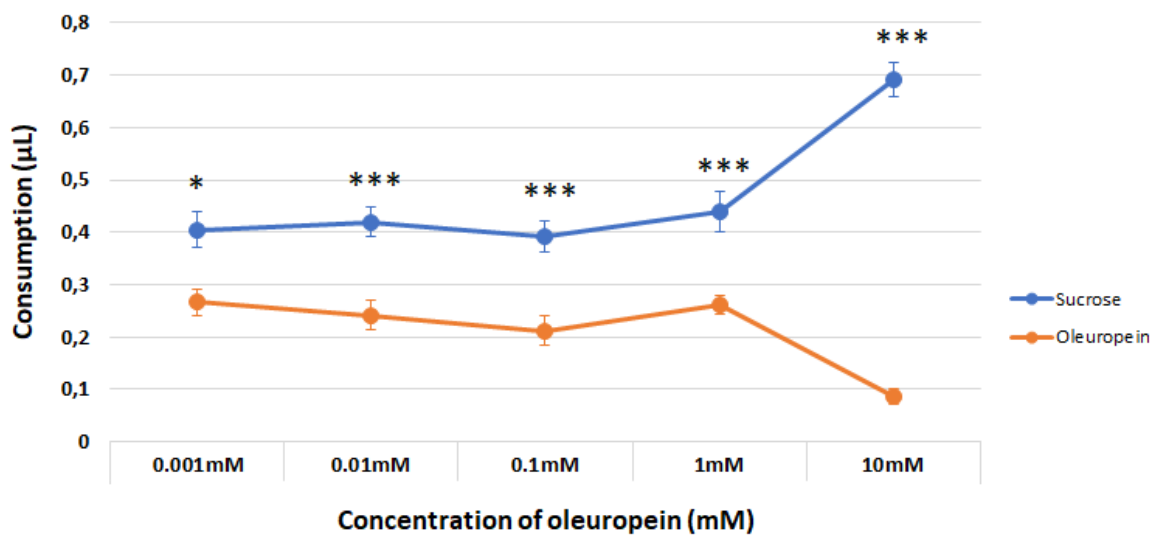


Figure 27 : Average consumption in a choice experiment between a sucrose (30mM) and a oleuropein/sucrose solution.

Choice experiment after 2 hours between a sucrose at 30mM solution (blue curve) versus an oleuropein solution mixed with sucrose 30mM (orange curve). Both curves are an average of 2 sessions (n=32 per concentration). A Wilcoxon paired test was performed, \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001.

### Survival and consumption of flies in long-term experiment

The survival of drosophila coupled with its consumption was followed over a long period of time (2 weeks). Flies have access to the sucrose solution (at 30 mM) and the mixture of sucrose (30mM) and oleuropein at the concentrations ranging from 0.001mM to 10mM.

For concentrations of oleuropein less than 10mM, the flies lived longer than the flies fed with only sucrose (**Figure 28A**). However, for the 10mM-concentration of oleuropein, the flies did not live as long, either the bitter taste takes over and that is why the lifespan of the flies was limited or the flies cannot stand the quantity of oleuropein to detoxify or absorb.

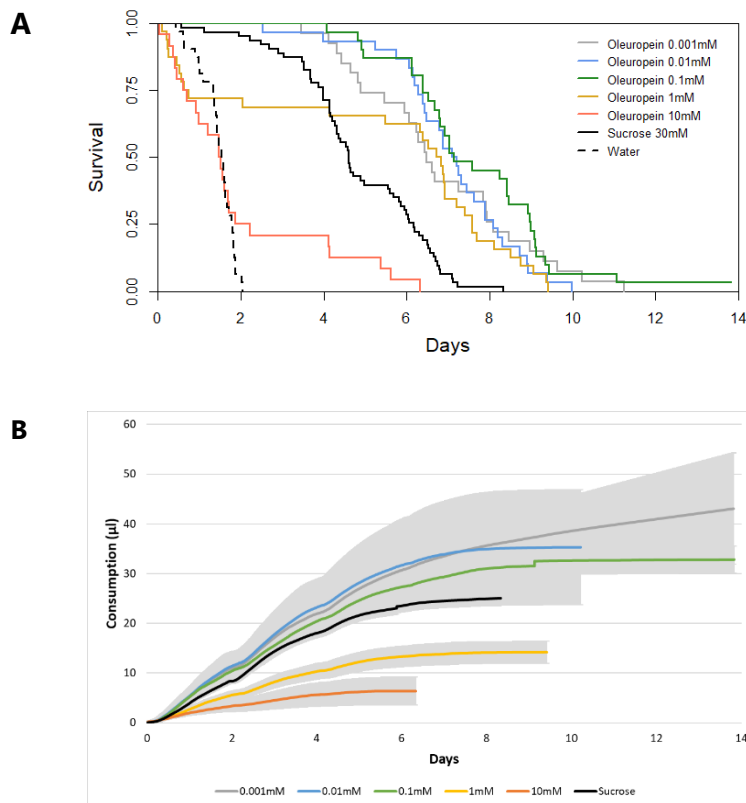


Figure 28: Survival of flies and their consumption of oleuropein in the multiCAFE device

(A) Survival curves of the flies fed with a choice of 2 capillaries one filled with sucrose (at 30 mM) and the other filled with the mixture of sucrose and oleuropein. The oleuropein concentration ranged from 0.001mM to 10mM. (n=32 per concentration) (B) Average consumption of sucrose / oleuropein solution by the flies. The grey shadows correspond to the SEM.

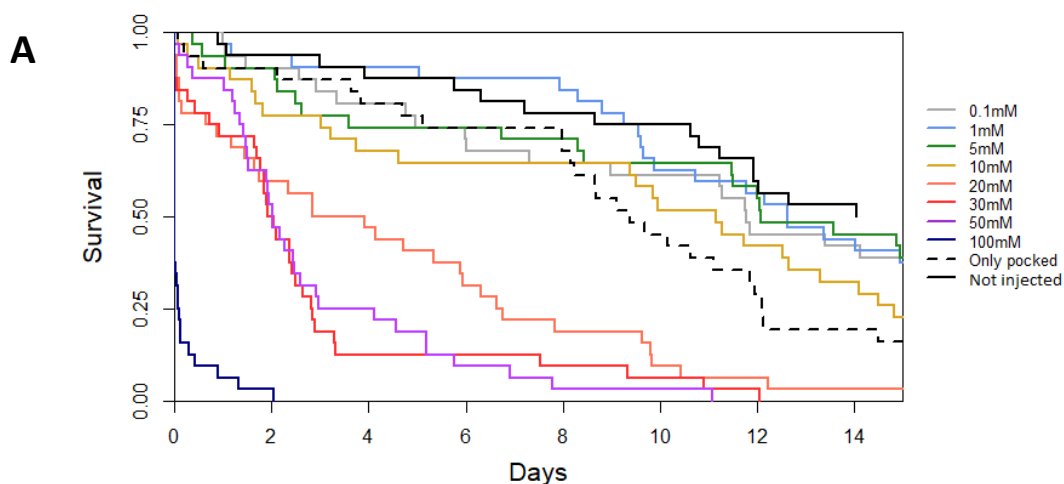
Moreover, there is no difference between the survival of flies at each concentration of oleuropein that induced an extension of life, except between 1mM and 0.1mM (**Table 3A**). As the consumptions are very similar for the concentrations of oleuropein between 0.1mM and 0.001mM, it explains the similar survival of the flies. Nevertheless, the consumption cannot be linked to the survival as for 1mM it was much less than the consumption of 0.01mM but the survival was similar (**Figure 28B**). Other mechanisms must play a part in the survival of the

flies in relation to the consumption of oleuropein like the capacity to absorb, detoxify or break it down to essential blocks.

## Survival and toxicity

Even if oleuropein seems to have a positive effect on the lifespan of the flies, we want to examine its toxicity by injecting it in the abdomen in order to overcome the bitterness that limits the molecule consumption. For the injection test, the oleuropein concentrations ranged from 0.1mM to 100mM.

While non-injected flies lived the longer, the ones that are injected with oleuropein concentration of 0.1 to 1mM lived longer than the pricked ones (**Figure 29A and Table 3B**). On the other hand, a kind of plateau was observed around day 3 after the injection which leads us to think that from day 0 (injection day) to 3 the acute toxicity response to oleuropein was present and from day 3 to the end of the experiment we have the post-ingestion mortality or the natural rate of death for this type of experiment.



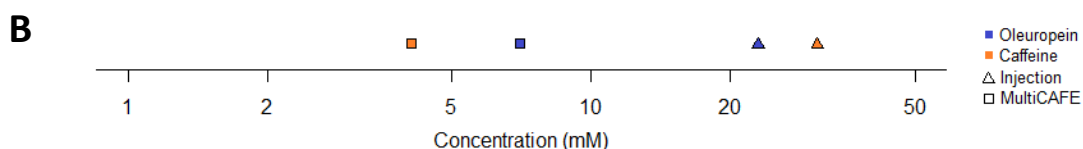


Figure 29 : Survival curves after the injection of oleuropein in the abdomen of flies and the lethal concentration 50 of oleuropein and caffeine

(A) Survival curves of the flies injected with a solution of oleuropein. The concentration of oleuropein ranges from 0.1mM to 100mM and the controls are flies that have only been pricked with the needle (only pocked) or had no treatment (nothing). (B) Lethal concentration 50 after 3 days of oleuropein. The LC50 is calculated for the flies that were injected (injection) and the ones fed on capillaries (MultiCAFE).

That is why day 3 was chosen as the timepoint to calculate the lethal concentration 50 (LC50) which is the concentration needed to have 50 percent of dead flies, both for injection and multiCAFE experiments. The determined LC50 values were compared with each other and also compared with those of caffeine (in the same experimental conditions). Caffeine was chosen as an important bitter molecule. **Figure 29B** shows that oleuropein seems to be more toxic than caffeine when injected into flies because it requires a lower concentration to have 50 percent death but the reverse is true in the multiCAFE experiment. We can conclude that oleuropein is less bitter than caffeine but it is more toxic for the flies. However, even if the abdomen's injection helps us mimic a consumption of food, it does not reflect the actual pathway. That is why we want to put a formulation strategy in place to hide the bitter taste of oleuropein and in the future, different molecules.

### The perception of $\beta$ -lactoglobulin by the flies

$\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) is the major whey protein belonging to the lipoprotein family. It is a globular protein containing 162 amino acid and its central structural element, so called calyx or  $\beta$ -barrel, is a hydrophobic ligand-binding pocket. It presents a widely diverse properties among them ligand-binding function, mainly with small hydrophobic molecules (Kontopidis *et al.* 2004).  $\beta$ -lg has the ability to bind various hydrophobic molecules such as fatty acids, lipids, cholesterol, aromatic compounds, vitamins, and polyamines (Kontopidis *et al.* 2004; Liang *et al.* 2007; Mensi *et al.* 2013). Moreover, interactions between  $\beta$ -lg and bitter molecules

(such as caffeine and quinine) have also been studied in order to assess their effects on the bitterness of these molecules (Tenney *et al.* 2017). Although quinine interacts strongly with  $\beta$ -lg, it has been shown that this protein limits the bitterness of quinine without suppressing it (Coupland and Hayes 2014; Tenney *et al.* 2017). On the other hand, Rudra *et al.* (2018) showed that strychnine binds with  $\beta$ -lg through hydrophobic interaction (Rudra *et al.* 2018). In this present study, we were interested in the interaction between oleuropein and  $\beta$ -lg and the effect of this interaction on the masking of the bitterness of oleuropein. It was previously shown that oleuropein binds to  $\beta$ -lg mainly via hydrophobic interaction, in the central calyx of  $\beta$ -lg and the surface of  $\beta$ -lg next to hydrophobic residues (Vanaei *et al.* 2020).

First of all, we studied the palatability or not of  $\beta$ -lg to the flies. Flies had thus a choice between a solution of 1%  $\beta$ -lg and a solution of 30mM-sucrose. In the absence of sucrose in the  $\beta$ -lg solution, flies always consume the sucrose solution (results not shown). This result was somewhat expected because the flies have no incentive to consume the  $\beta$ -lg solution. However, when flies had a choice between sucrose solution and the protein mixed with sucrose, they consumed much more the latter than the sucrose solution alone (**Figure 30**), on a consumption experiment of 2 hours.

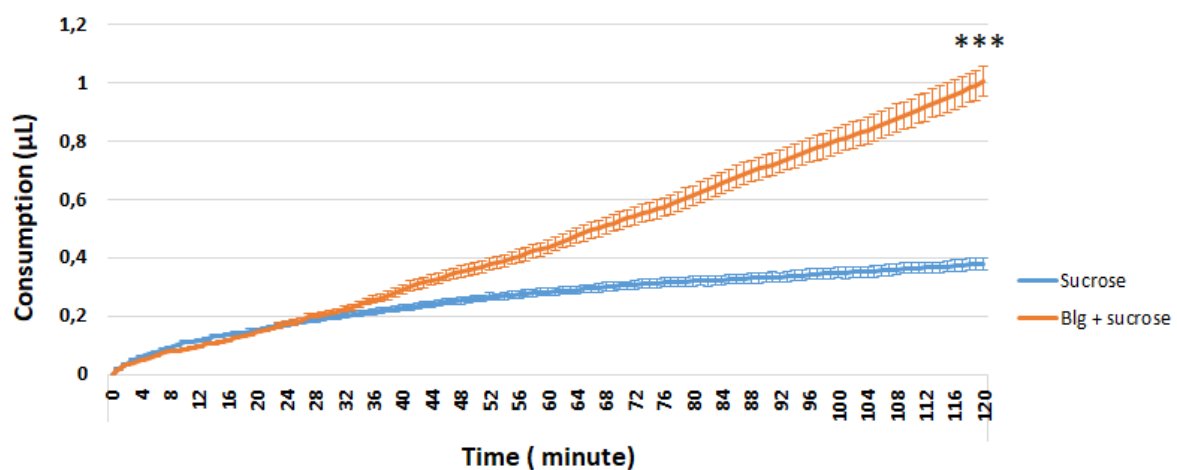


Figure 30 : Choice experiments between sucrose solution at 30 mM concentration (blue curve) and a mixture of 1%  $\beta$ -lg and 30mM-sucrose solution (orange curve).

A Wilcoxon paired test was performed (n=117), \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001.

The mixed solution  $\beta$ -lg with sucrose was more appetent to flies than sucrose, which may be advantageous in masking the bitter taste of the studied molecule, i.e., oleuropein. This increase in palatability could be explained by a synergy between  $\beta$ -lg and sucrose enhancing the consumption of the mixed solution. Indeed, usually, in olfaction or in taste, it is well-known that molecules in a binary mixture (or more) can have positive or negative interactions (Servant *et al.* 2011; Singh *et al.* 2019). In addition, the mixed solution was consumed significantly more than sucrose solution probably due of the lower surface tension in the mixture, making the latter easier to “pump” by flies. In fact, the interactions between proteins and sugars are weak and in general non-specific (Timasheff 1993) and the presence of sucrose in protein solution enhances the protein concentration at the superficial layer by the exclusion volume effect and then contributes to the reduction of a surface tension (Oliveira Neves *et al.* 2018).

### **Does interaction between $\beta$ -lg and oleuropein contribute to the attenuation of the bitter taste of oleuropein?**

It was previously found in literature that oleuropein interact with  $\beta$ -lg mainly via hydrophobic interaction (Vanaei *et al.* 2020). The main question asked here is does this interaction help to totally or partially mask the bitter taste of oleuropein?

Oleuropein was solubilized at different concentrations in 1% $\beta$ -lg solution. The sucrose was then added to all solutions at the concentration of 30 mM. The consumption test was carried out on flies giving them the choice between two solutions,  $\beta$ -lg/sucrose solution and  $\beta$ -lg/oleuropein/sucrose solution.

In order to compare if the  $\beta$ -lg is sufficient to hide the bitter taste of oleuropein we calculated the preference index (P.I.) for the choice in the short-term for the 2 experiments. The different times were merged in order to have the average consumption for the 2 experiments. We observe that at 0.001, 0.01 and 0.1mM the  $\beta$ -lg seems to be present in a concentration that allows to hide the bitter taste (Figure 6B). However, at 1mM and 10mM, the  $\beta$ -lg is not powerful enough to mask the taste. This perception by the flies resemble what we saw with the spectrometry, at those 2 concentrations, the oleuropein absorption spectrum is greater than the one of  $\beta$ -lg whereas, at the 3 lower concentrations, the absorbance of  $\beta$ -lg seems to be more important.

It appears that  $\beta$ -lactoglobulin is a good protein the start hiding the bitter taste.

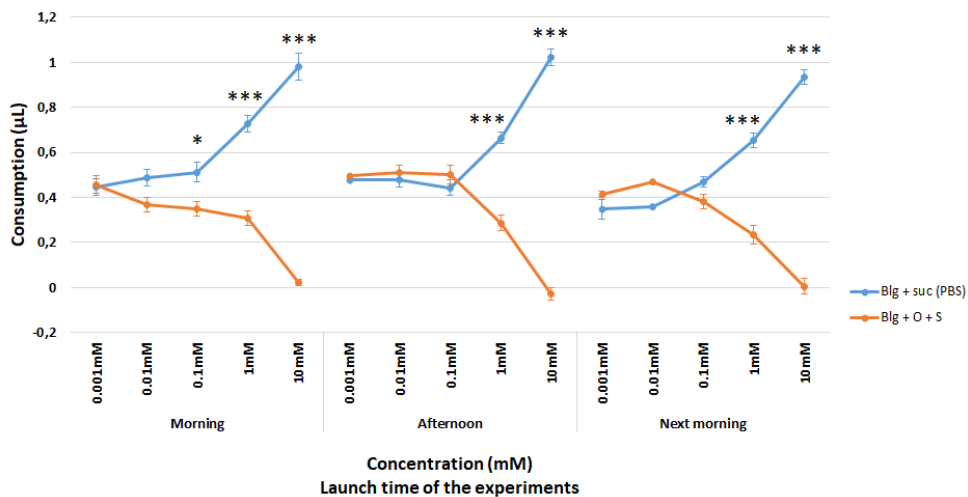


Figure 31 : Hiding of the bitter taste of oleuropein

Choice experiment after 50 minutes between a  $\beta$ -lg and sucrose solution (blue) versus an oleuropein,  $\beta$ -lg and sucrose solution (orange). Each point is the average of the consumption for the flies at each concentration in the experiment (n=30). The experiment was done at 3 different time of the day, in the morning, in the afternoon and the next morning. A Wilcoxon paired test was performed, \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001.

**Figure 31** shows the evolution of total consumption of both solutions after 50 minutes. The volume consumed was similar (~ 0.4  $\mu$ L) between the two solutions presented to the flies for an oleuropein concentration less than or equal to 0.1 mM, which is 1.5 to 2 times more than the consumption of oleuropein alone (figure 1) at the same concentrations. On the other hand, for the oleuropein concentrations of 1 mM and 10 mM, the flies preferred to consume the  $\beta$ -lg/sucrose solution, or even no longer consumed the  $\beta$ -lg/oleuropein/sucrose solution when the oleuropein concentration was of 10 mM. These results were confirmed by calculating the preference index (P.I.) for the choice in the short-term experiments (**Figure 32**). It was observed that at 0.001, 0.01, and 0.1 mM the  $\beta$ -lg seemed to be present at a concentration which made it possible to mask the bitter taste. However, at 1mM and 10mM the  $\beta$ -lg was not concentrated enough to mask the taste. All these observations show that the protein would mask the bitter taste of oleuropein, when the concentration of the latter is less than or equal to 0.1 mM, probably via hydrophobic interactions between the two molecules. Beyond 1 mM, these interactions are not sufficient to mask the oleuropein bitterness. It would then be



interesting to increase the protein concentration to see its effect on the masking of oleuropein bitterness.

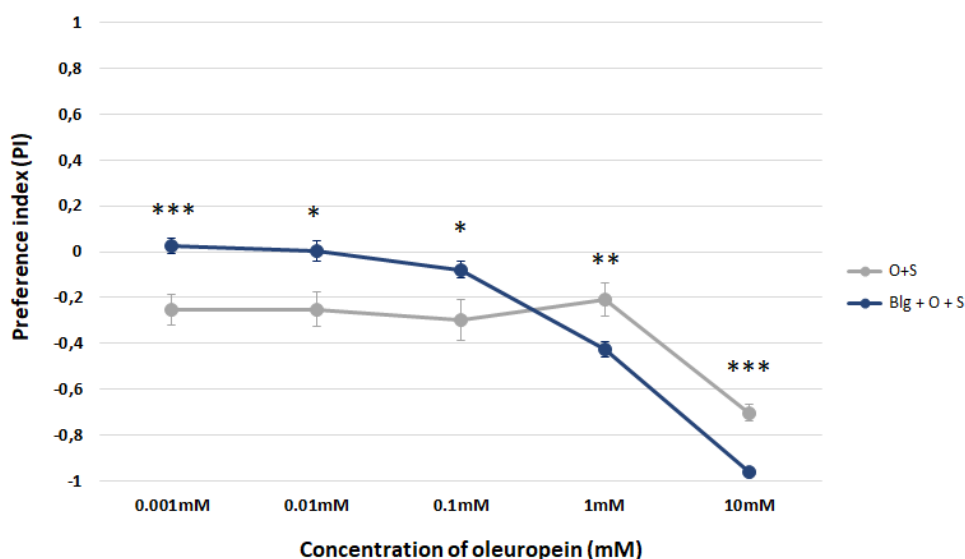


Figure 32: Preference index of oleuropein

Preference index for the experiment of the panel A (in dark blue) and for the one of Figure 1 (grey) at  $t=50$  minutes (data not showed). A Wilcoxon unpaired test was performed ( $n=32$ ), \*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ .

#### 4. CONCLUSION

Usually when bitter taste is studied, it is coupled with the observation of an avoidance behavior and toxicity. In this paper, we were interested in the perception of oleuropein, a phenolic compound of olive oil that is highly beneficial for human health but also highly bitter (Barbaro *et al.* 2014). The main aim of our study was to study the potential of  $\beta$ -lg to mask the bitter taste of oleuropein for *Drosophila melanogaster*.

When oleuropein was presented *ad libitum* to flies with the choice between a sucrose solution alone and oleuropein/sucrose solution, the flies always chose the sucrose solution. This response proves that oleuropein is not a neutral tasting compound and that sucrose cannot conceal the bitter taste on its own, only perhaps decreases the bitter power as it has been observed for multiple sweet-bitter interactions (Keast and Breslin 2002).

Oleuropein has been reported to have several beneficial effects on animal health (Coni *et al.* 2000; Tuck and Hayball 2002; Çömez *et al.* 2020) and even though the survival was not looked at, we can presume that a healthier organism equals a longer lifespan compare to a sick one. In both our experiments, whether the flies are feeding on a solution of oleuropein/sucrose or the oleuropein was injected in their abdomen, we observed that at some concentrations the survival was greater than the one of the controls which allows us to say that oleuropein has an hormetic effect on the flies. When we compared the toxicity of oleuropein in the context of the 2 experiments, we saw that it is less toxic when it was injected because the bitter taste in high concentrations in the event of ingestion creates a consumption bias which increases toxicity.

In a second step, we tried to hide or to decrease the bitter taste of oleuropein through interactions with the  $\beta$ -lactoglobulin in order to allow flies to take full advantage of the health benefits that this molecule. At the studied protein concentration,  $\beta$ -lg seemed to hide the bitter taste of oleuropein for oleuropein concentration less or equal to 0.1 mM beyond that, the flies detected the bitterness of oleuropein and decreased or stopped consuming the oleuropein/ $\beta$ -lg/ sucrose mixture.  $\beta$ -lactoglobulin seems to be promising in masking the bitterness of oleuropein, however its concentration should be optimized according to the concentration of the molecule to be masked. Moreover, understanding the interactions between the two molecules through, for example, fluorescence spectroscopy or circular dichroism, could help to understand the mechanism of bitter taste masking of oleuropein.

## 5. SUPPLEMENTARY FIGURES

**A**

	0.001mM	0.01mM	0.1mM	1mM	10mM	sucrose	water
0.001mM		0,8	0,2	0,2	7,00E-11	8,00E-06	5,00E-16
0.01mM			0,1	0,3	5,00E-14	6,00E-09	<2e-16
0.1mM				0,02	1,00E-14	7,00E-11	<2e-16
1mM					8,00E-06	1,00E-04	6,00E-07
10mM						3,00E-09	0,2
sucrose							<2e-16
water							

**B**

	0.1mM	1mM	5mM	10mM	20mM	30mM	50mM	100mM	pocked	nothing
0.1mM		1	0,5	0,2	1,00E-06	1,00E-09	8,00E-10	<2e-16	0,01	0,40
1mM			0,9	0,1	7,00E-09	8,00E-12	1,00E-12	<2e-16	3,00E-03	0,5
5mM				0,1	7,00E-07	4,00E-09	2,00E-09	<2e-16	0,1	0,6
10mM					1,00E-04	3,00E-07	3,00E-07	8,00E-16	0,70	0,1
20mM						0,08	0,06	4,00E-11	2,00E-04	7,00E-09
30mM							0,9	8,00E-11	4,00E-08	4,00E-12
50mM								3,00E-13	4,00E-09	1,00E-12
100mM									<2e-16	<2e-16
pocked										0,007
nothing										

Table 3: Statistical analysis

(A) Statistical analyses of the survival curves for long-term multiCAFE. (B) Statistical analyses of the survival curves for the injections. We used the "survdif" command of the survival package in R. The curves are compared 2 by 2 which is why half of the table is in black.

## 6. REFERENCES

- Al-Shabib, N. A., J. M. Khan, A. Malik, M. A. Alsenaidy, M. T. Rehman, M. F. Alajmi, A. M. Alsenaidy, F. M. Husain and R. H. Khan (2018). "Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies." Journal of Molecular Liquids **269**: 511-520.
- Barbaro, B., G. Toietta, R. Maggio, M. Arciello, M. Tarocchi, A. Galli and C. Balsano (2014). "Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health." International Journal of Molecular Sciences **15**(10): 18508-18524.
- Breslin, P. A. S. (1996). "Interactions among salty, sour and bitter compounds." Trends in Food Science & Technology **7**(12): 390-399.
- Breslin, P. A. S. and G. K. Beauchamp (1995). "Suppression of bitterness by sodium: Variation among bitter taste stimuli." Chemical Senses **20**(6): 609-623.
- Breslin, P. A. S. and G. K. Beauchamp (1997). "Salt enhances flavour by suppressing bitterness." Nature **387**(6633): 563-563.
- Brownlow, S., J. H. Morais Cabral, R. Cooper, D. R. Flower, S. J. Yewdall, I. Polikarpov, A. C. T. North and L. Sawyer (1997). "Bovine b-lactoglobulin at 1.8 Å resolution —still an enigmatic lipocalin." Structure **5**(4): 481-495.
- Çömez, M. S., M. Cellat, H. Özkan, Y. Borazan, T. Aydın, I. Gökçek, E. Türk, M. Güvenç, A. Çakır and S. Y. Özsoy (2020). "Protective effect of oleuropein on ketamine-induced cardiotoxicity in rats." Archives of Pharmacology **393**: 1691-1699.
- Coni, E., R. Di Benedetto, M. Di Pasquale, R. Masella, D. Modesti, R. Mattei and E. A. Carlini (2000). "Protective Effect of Oleuropein, an Olive Oil Biophenol, on Low Density Lipoprotein Oxidizability in Rabbits." Lipids **35**(1): 45-54.
- Coupland, J. N. and J. E. Hayes (2014). "Physical approaches to masking bitter taste: Lessons from food and pharmaceuticals." Pharmaceutical Research **31**(11): 2921-2939.
- Dan, Q., W. Xiong, H. Liang, D. Wu, F. Zhan, Y. Chen, S. Ding and B. Li (2019). "Characteristic of interaction mechanism between  $\beta$ -lactoglobulin and nobiletin: A multi-spectroscopic, thermodynamics methods and docking study." Food Research International **120**: 255-263.
- David, J. R. (1962). "A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions." Drosophila Information Service **36**: 128.
- de Chaumont, F., S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Herve, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour and J. C. Olivo-Marin (2012). "Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research." Nature Methods **9**(7): 690-696.
- de la Puerta, R., V. Ruiz Gutierrez and J. R. S. Hault (1999). "Inhibition of Leukocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgin Olive Oil." Biochemical Pharmacology **57**(4): 445-449.
- Kamen, J. M., F. J. Pilgrim, N. J. Gutman and B. J. Kroll (1961). "Interactions of suprathreshol taste stimuli." Journal of Experimental Psychology **62**(4): 348-356.
- Keast, S. J. R. and P. A. S. Breslin (2002). "An overview of binary taste-taste interactions." Food Quality and Preference **14**(2): 111-124.

- Kontopidis, G., C. Holt and L. Sawyer (2004). "Invited Review:  $\beta$ -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function." Journal of Dairy Science **87**(4): 785-796.
- Liang, L., H. A. Tajmir-Riahi and M. Subirade (2007). "Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications." Biomacromolecules **9**(1): 50-56.
- Mensi, A., Y. Choiset, H. Rabesona, T. Haertlé, P. Borel and J.-M. Chobert (2013). "Interactions of  $\beta$ -Lactoglobulin Variants A and B with Vitamin A. Competitive Binding of Retinoids and Carotenoids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(17): 4114-4119.
- Oliveira Neves, I. C., J. Teles de Faria, M. C. Teixeira Ribeiro Vidigal, P. Cardoso Fidelis, V. P. Rodrigues Minim and L. A. Minim (2018). "Foaming properties of suspensions composed by  $\beta$ -lactoglobulin and polysaccharides, in the presence of sucrose or polyols." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **550**: 199-208.
- Pacheco, A. G. and M. D. Rebelo (2013). "A simple R-based function to estimate lethal concentrations." Marine Environmental Research **91**: 41-44.
- Paiva-Martins, F., V. Rodrigues, R. Calheiros and M. P. M. Marques (2011). "Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods." Journal of the Science of Food and Agriculture **91**(2): 309-314.
- Rich, J. T., J. G. Neely, R. C. Paniello, C. C. J. Voelker, B. Nussenbaum and E. W. Wang (2010). "A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves." Otolaryngology-Head and Neck Surgery **143**(3): 331-336.
- Rudra, S., A. Jana, N. Sepay, B. K. Patel and A. Mahapatra (2018). "Characterization of the binding of strychnine with bovine b-lactoglobulin and human lysozyme using spectroscopic, kinetic and molecular docking analysis." New Journal of Chemistry **42**: 8615-8628.
- Sasha, B. and J. Leibowitz (1961). "On the Oleuropein, the Bitter Principle of Olives." Journal of Organic Chemistry **26**(6): 1948-1954.
- Schiffman, S. S., L. A. Gatlin, E. A. Sattely-Miller, B. G. Graham, S. A. Heiman, W. C. Stagner and R. P. Erickson (1994). "The Effect of Sweeteners on Bitter Taste in Young and Elderly Subjects." Brain Research Bulletin **35**(3): 189-204.
- Servant, G., C. Tachdjian, X. D. Li and D. S. Karanewsky (2011). "The sweet taste of true synergy: positive allosteric modulation of the human sweet taste receptor." Trends in Pharmacological Sciences **32**(11): 631-636.
- Singh, V., N. R. Murphy, V. Balasubramanian and J. D. Mainland (2019). "Competitive binding predicts nonlinear responses of olfactory receptors to complex mixtures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **116**(19): 9598-9603.
- Tenney, K., J. Hayes, S. Euston, R. Elias and J. N. Coupland (2017). "Binding of Caffeine and Quinine by Whey Protein and the Effect on Bitterness." Journal of Food Science **82**(2): 509-516.
- Timasheff, S. N. (1993). "The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvent Affect These Processes?" Annual Review in Biophysical and Biomolecular Structure **22**: 67-97.
- Tuck, K. L. and P. J. Hayball (2002). "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects." Journal of Nutritional Biochemistry **13**: 636-644.

- Vanaei, S., M. S. Parizi, S. Abdolhosseini and I. Katouzian (2020). "Spectroscopic, molecular docking and molecular dynamic simulation studies on the complexes of  $\beta$ -lactoglobulin, safranal and oleuropein." International Journal of Biological Macromolecules **165**(Part B): 2326-2337.
- Wang, R., Y. Liu, X. Hu, J. Pan, D. Gong and G. Zhang (2019). "New insights into the binding mechanism between osthole and  $\beta$ -lactoglobulin: Spectroscopic, chemometrics and docking studies." Food Research International **120**: 226-234.



# **Discussion**





# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

L'objectif principal de ma thèse était d'examiner si l'on pouvait établir une relation entre amertume et la toxicité. La question se pose en effet de savoir quel est le rôle des substances amères chez les plantes. Celles-ci sont connues pour élaborer des substances toxiques pour se défendre contre les herbivores mais elles produisent également une myriade de molécules amères, pas forcément toxiques. Chez les herbivores, l'attention s'est portée principalement jusqu'ici sur les systèmes de détoxification et l'évolution de résistances vis-à-vis des substances à effet insecticide. Très peu de données existent sur l'adaptation du système gustatif à ces défenses, l'hypothèse de travail invariablement mise en avant consistant à considérer que ce système comporte des cellules chargées de détecter des composés potentiellement toxiques, système qualifié de système de détection de l'amer.

Si le système de détection de l'amer joue bien ce rôle, il devrait exister une relation assez étroite entre la toxicité des molécules et leur amertume chez les organismes qui y sont exposés. Une confirmation indirecte de cette hypothèse a été évoquée en introduction, car nous avons vu que les espèces généralistes ont beaucoup plus de récepteurs à l'amer que les spécialistes. Cependant, l'existence d'une relation directe entre toxicité et amertume reste une hypothèse qui a été très peu explorée jusqu'à présent. Nous avons cité le travail de J. Glendinning qui a mené une méta-analyse de la sensibilité à l'amer chez les vertébrés et qui a conclu à une relation inconsistante (Glendinning 1994). Plus récemment, un groupe israélien a constitué une base de données des substances amères pour l'homme et l'a croisée avec des données de toxicité (Dagan-Wiener *et al.* 2017; Nissim *et al.* 2017). Ces auteurs concluent que seulement 50% des molécules toxiques ont des signatures moléculaires permettant de prédire une amertume.

La question d'une relation directe entre amertume et toxicité reste donc ouverte, au moins pour les Vertébrés. Chez les insectes, peu de données existent à ce sujet si ce n'est une série de travaux menées par Bernays et Chapman, notamment sur les locustes et une masse d'observations impressionnante concernant l'identification de molécules amères extraites de

plantes (Koul 2004). Une des difficultés majeures dans l'examen de cette question consiste à mettre au point un dispositif expérimental qui permette de dissocier les deux composantes, toxicité et détection sensorielle. En effet, pour qu'une substance toxique (par ingestion) soit active, il faut qu'elle soit ingérée. Or, si elle est amère, elle ne sera pas ingérée. Plusieurs méthodes ont été proposées par Bernays (1991) pour évaluer la toxicité par ingestion de composés secondaires de plantes chez *Schistocerca gregaria*, en masquant leur goût amer, par exemple en les incluant dans des capsules de gélatine ou en utilisant de la beta-cyclodextrine ou encore en utilisant une canule pour injecter directement ces composés dans le tube digestif moyen (Szentesi and Bernays 1984). De manière étonnante, dans les articles cités et d'autres encore, elle a observé que très peu de composés amers testés présentaient une réelle toxicité.

Nous avons voulu examiner cette question chez *Drosophila melanogaster* qui est considérée comme un insecte relativement polyphage, afin d'établir des protocoles de test qui nous permettent ultérieurement d'utiliser les outils génétiques disponibles chez cette espèce pour éventuellement inactiver le système sensoriel. Les expériences que nous avons menées ont consisté à tester un panel de 7 molécules (berbérine, caféine, escine, benzoate de dénatonium, nicotine, paraquat et quinine) connues pour être amères chez l'homme et certains insectes et à évaluer leur amertume et leur toxicité chez la drosophile adulte. Nous avons également commencé à évaluer une méthode chimique pour masquer le goût amer des molécules en les complexant avec une protéine.

## 1. TESTS DE CONSOMMATION

Les modifications et l'automatisation que nous avons fait du test de consommation grâce à des capillaires, le CAFE assay, sont tout à fait originales et comparables, sinon supérieures à d'autres méthodes automatisées qui ont été proposées durant ou juste avant notre travail de thèse.

Le dispositif le plus proche du nôtre est le test ARC (Activity Recording Capillary Feeder), également adapté du système CAFE (Murphy *et al.* 2017). Dans un portoir avec des chambres closes par une face en plexiglass, une caméra infrarouge est utilisée pour enregistrer la consommation et l'activité d'une vingtaine de drosophiles. Le portoir se trouve devant une

série de lumières LED infra-rouges qui permettront, suite à l'ajout d'une bande de colorant au niveau du ménisque, de déterminer la consommation individuelle des drosophiles. Ce dispositif permet d'avoir un cycle jour/nuit mais il faut pour cela s'équiper de caméras infra-rouges.

Une autre adaptation du CAFE est la méthode Espresso de Yapici (Yapici *et al.* 2016). Les mouches se nourrissent à partir d'un capillaire posé sur une diode photosensible qui permet de détecter la diminution de la solution. Ils obtiennent des données précises individuelles, mais là encore, la drosophile n'a accès qu'à un seul capillaire et il n'est donc pas possible de lui offrir un choix dans la solution.

Une autre méthode est celle développée par Itskov, le flyPAD, qui supprime l'utilisation de caméras (Itskov *et al.* 2014). Dans ce système, il utilise la capacitance pour déterminer la consommation des drosophiles. Une solution liquide repose dans un trou sur une première électrode et tout autour de l'accès supérieur se trouve la deuxième électrode. Lorsque la drosophile vient manger, elle ferme le circuit, ce qui entraîne la détection de la capacitance par un ordinateur qui donne précisément combien de fois et pendant combien de temps la drosophile était en contact avec la nourriture avec une précision de l'ordre de la milliseconde. Le système FLIC développé par Ro repose sur un principe similaire, sauf que ce qui est mesuré est une variation d'impédance entre la mouche et le substrat alimentaire (Ro *et al.* 2014). Une drosophile en se nourrissant ferme le circuit électrique, ce qui implique le passage d'un courant électrique et peut engendrer une stimulation aversive pour la mouche. Ces systèmes offrent une bonne résolution temporelle des activités alimentaires des mouches, mais elles ne permettent en aucun cas de mesurer directement les quantités ingérées, sinon par une estimation indirecte.

Le multiCAFE est donc à ce jour une méthode facile à mettre en place mais dont l'analyse des données prend un peu de temps. Toutefois, nous sommes capables d'avoir des mesures très précises de la consommation individuelle des drosophiles et de suivre en même temps leur activité. De plus, les portoirs peuvent être modifiés pour héberger plusieurs mouches en faisant des cages plus grandes ce qui permet aussi de mettre plus de 2 capillaires. Cependant, dans ce cas, il n'est plus possible de mesurer la consommation de chaque mouche.

Comme tout design expérimental, notre système présente aussi des inconvénients. L'un de ces inconvénients est la nécessité d'utiliser un colorant alimentaire pour visualiser la solution dans les capillaires. Bien qu'il ait été montré que le colorant bleu alimentaire n'avait pas d'impact sur les drosophiles (Tanimura *et al.* 1982), nous ne savons pas jusqu'à quel point cela reste vrai. Afin de prévenir la remontée de la solution dans nos capillaires pour nos tests sur le long terme, nous avons proposé d'utiliser un « bouchon » d'agar placé en bas de chaque capillaire. Bien que les mouches puissent manifestement consommer la solution liquide, la présence d'agar retarde le début de la consommation. Enfin, bien que ce soit très pratique pour l'expérimentateur, une drosophile isolée n'a pas forcément le même comportement que lorsqu'elle se trouve avec ses congénères, mais malheureusement, nous ne sommes pas encore capables de mesurer la consommation individuelle lorsque deux ou plusieurs drosophiles sont présentes dans une cage.

## **2. CHOIX ALIMENTAIRE A COURT TERME**

Grâce au suivi de la consommation réelle et individuelle des drosophiles sur un temps court en conditions de choix, nous avons pu caractériser la cinétique de consommation des mouches sur 2 h. Dans l'ensemble des expériences réalisées, nous avons pu constater que les courbes cumulées des mouches suivaient quasiment des droites de pente différente si les deux capillaires étaient discriminés. Cela signifie que les choix sensoriels effectués évoluent peu avec le temps. Cette constance suggère qu'à cette échelle de temps et pour ces composés, les mécanismes post-ingestifs jouent un rôle mineur.

Nous avons pu également observer deux stratégies d'exploitation des ressources. La première stratégie consiste à consommer une quantité fixe de sucre et à concentrer la consommation sur le capillaire ne contenant pas de substance amère. C'est le cas des expériences réalisées avec la caféine, la quinine, la berbérine, le benzoate de dénatonium et le paraquat. Les drosophiles sont capables de discriminer les deux solutions, amères ou non, grâce à leurs chimiorécepteurs périphériques.

Le second mécanisme, et je dirais même le plus intéressant, est lorsque les drosophiles diminuent leur consommation totale plus l'amertume augmente. Cette réduction de consommation totale est peut-être due à un défaut de perception gustative ou à un effet

« post-ingestif » rapide. Ce mécanisme pourrait être analogue à celui qui avait été montré chez le sphinx du tabac (*Manduca sexta*) par Glendinning (1996). Dans cette expérience, celui-ci avait montré que des larves élevées sur un milieu sans nicotine étaient affectées par ce composé et évitaient de consommer un milieu contaminé, alors même qu'aucune activité sensorielle n'était détectable au niveau des sensilles gustatives en électrophysiologie (Glendinning 1996). Deux hypothèses pourraient expliquer ces observations. Le premier mécanisme impliquerait une réaction post-ingestive rapide pour la nicotine et l'escine, et leurs chimiorécepteurs périphériques seraient relativement peu sensibles à ces composés. En l'absence de détection d'amertume, les insectes pourraient alors cesser de s'alimenter. Le deuxième mécanisme pourrait consister à une inactivation temporaire des récepteurs du sucre et/ou à une activation prolongée des cellules sensibles à l'amer. Si des molécules comme la nicotine et l'escine restent actives dans les sensilles des drosophiles pendant un temps plus long qu'il ne faut pour passer du capillaire traité (sucre+amer) au capillaire non traité (sucre), alors les mouches auront beaucoup plus de mal à discriminer ces deux capillaires. Il faut remarquer cependant que nicotine et escine n'ont pas forcément le même statut pour la drosophile que la nicotine chez le sphinx du tabac, puisque ces deux composés sont détectés par des cellules de l'amer (Weiss *et al.* 2011; Rimal and Lee 2019) alors que ce n'est apparemment pas le cas chez le sphinx du tabac.

Nous nous sommes intéressés à un mutant gustatif afin de savoir si notre dispositif permettait d'avoir des informations supplémentaires par rapport aux tests binaires. Le gène Gr66a étant impliqué dans la détection de la caféine et d'autres substances amères, nous avons pensé qu'un mutant de Gr66a nous permettrait de vérifier expérimentalement qu'une difficulté de perception de l'amer pourrait induire un rejet des deux solutions.

Avec les mutants Gr66a, je pensais que deux réponses pouvaient être possible. Le mutant ne percevant pas la caféine, même en situation de choix, ne pouvant pas faire la différence, soit il consomme une quantité normale des deux capillaires, soit il diminue très fortement sa quantité ingérée, quelle que soit la concentration de caféine. Or, les mutants pour Gr66a que nous avons testés présentaient bien une altération de la consommation de caféine, en consommant moins, car ils ne compensaient pas comme nous avons vu nos drosophiles sauvages le faire, confirmant les résultats de Moon (Moon *et al.* 2006).

Cependant, les contrôles de cette lignée mutante présentaient un comportement bizarre. En effet, les drosophiles *w*<sup>1118</sup> n'arrivaient pas à faire la différence entre le saccharose et la caféine sauf à la concentration la plus élevée en caféine. Mais, pour la quinine et la nicotine, sa consommation ressemble à celle de la lignée sauvage Canton S. Comme la lignée *w*<sup>1118</sup> a une mutation dans le transporteur ABC lui conférant les yeux blancs et qu'ils sont utilisés dans la détoxification, cette déficience du transporteur est peut-être à l'origine de ce comportement inattendu (Ewart and Howells 1998; Dermauw and Van Leeuwen 2014). Il serait possible de tester cette hypothèse en faisant un test de survie. En effet, si les drosophiles ne sont plus capables de détoxifier la caféine, elles devraient mourir plus vite qu'une lignée sauvage.

L'étude que nous avons réalisée reste cependant limitée. Nous nous sommes limités à la détection de l'alimentation de substances qui sont mélangées à de l'eau. Cependant la composition du milieu et en particulier son état d'hydratation peuvent avoir une influence sur l'activité alimentaire (Apostolopoulou *et al.* 2014) et peut-être influencer l'efficacité relative de nos molécules amères. D'autre part, l'échantillon de substances amères que nous avons étudiées est très limité. Nous sommes sans doute passés à côté d'autres réponses possibles, en particulier à des molécules amères plus pertinentes pour la survie de l'espèce. Enfin, les résultats que nous avons obtenus en étudiant le mutant Gr66a ne concernent qu'un seul gène gustatif commun aux cellules amères, et on ne sait pas si les co-récepteurs associés ne prennent pas le relais - il faudrait tester d'autres co-récepteurs impliqués dans la détection de l'amer comme Gr33a ou Gr93a (Lee *et al.* 2009; Moon *et al.* 2009)

### **3. ALIMENTATION ET SURVIE SUR MILIEU AMER**

Grâce à notre système de multiCAFE, nous avons pu réaliser des expériences sur le long terme, chose qui n'est normalement pas fait. En changeant les capillaires, qui sont la source de nourriture, tous les 2-3 jours, nous sommes capables de suivre la consommation et la survie de drosophiles individuellement tout au long de leur vie. Normalement l'amertume d'une molécule est évaluée par des tests courts qui ne prennent pas en compte les effets post-ingestifs (Weiss *et al.* 2011; Chen *et al.* 2019).

En couplant cette expérience à des injections qui étaient destinées à déterminer la toxicité de nos composés tests, nous avons pu voir à quel point l'amertume influence les choix de

consommation et la survie. Ce que nous avons observé, c'est que les drosophiles cherchent plutôt à avoir un apport en sucre constant quelle que soit la concentration en produit amer. Mais pour la concentration la plus élevée que nous ayons testée (1mM ou 10mM), l'amertume est trop puissante et les drosophiles ne consomment pas, ce qui revient à se laisser mourir de faim.

La principale conclusion que nous pouvons tirer de ce travail est qu'il n'y a pas de relation stricte entre amertume et toxicité parmi les 7 molécules que nous avons testées. Pour qu'il y ait un lien, peut-être que nous n'avons pas choisi les bonnes substances ? En effet, peut-être qu'il y a seulement un lien qu'entre les substances amères auxquelles l'organisme a été confronté au cours de son évolution. Pour tester cette hypothèse, il faudrait choisir les bonnes substances amères et toxiques. Enfin, il n'y a peut-être pas un lien entre la toxicité d'une molécule et « l'amertume » détectée dans les aliments. Une observation est particulièrement éclairante à cet égard : des blattes exposées à des pièges alimentaires contenant du glucose et un insecticide ont développé une résistance à ces pièges grâce à une mutation du système gustatif qui détecte comme amer non pas l'insecticide, mais le glucose qui est associé à sa présence (Wada-Katsumata *et al.* 2013; Wada-Katsumata *et al.* 2018). Ce n'est donc pas les propriétés des molécules toxiques qui importent, mais bien la constante d'une association entre un effet toxique et la présence d'une molécule « signal » qui est détectée par le système gustatif.

Mon étude a toutefois plusieurs limites, la première étant qu'il est très compliqué de séparer les deux modalités de l'amertume et de la toxicité. Malgré nos efforts, l'injection ne reflète que partiellement la toxicité car la solution n'emprunte pas le « trajet » classique de la digestion. En effet, l'ingestion des molécules toxiques implique un passage par les parties buccales et par le crop puis le tube digestif moyen (Gelperin 1971; Glendinning 2002; Hartmann *et al.* 2005), où se trouvent des cellules qui peuvent potentiellement activer des mécanismes non activés lors d'une injection dans la cavité générale. La seconde est qu'avec des tests de consommation, bien que la nourriture passe par le chemin naturel pour pouvoir déterminer la toxicité, l'amertume aura toujours un impact et faussera l'estimation de la nocivité des produits.

De manière incidente, nous avons observé que l'agar utilisé en bas des capillaires pour éviter la remontée du liquide, diminuait au cours de l'expérience. Cela nous suggère que les



drosophiles n'ont pas seulement une activité d'adsorption des liquides, mais qu'elles excrètent aussi des sucs digestifs dans la solution. L'identité des enzymes impliquées dans cette digestion n'est à notre connaissance pas connue. En tout cas, une telle excrétion peut avoir un effet sur la composition du liquide ingéré et sa viscosité, ce qui pourrait être à l'origine des phénomènes de remontée de liquide que nous avons cherché à éviter en utilisant un « bouchon » d'agar. Analyser la solution en bas des capillaires à la suite d'activités alimentaires pourrait nous donner une meilleure compréhension de la relation entre l'insecte et son milieu nutritif.

Afin de réellement tester la toxicité sans être surestimée par l'amertume, il faudrait réussir à masquer le goût amer par des moyens d'encapsulation car le simple ajout d'une autre modalité gustative n'est pas suffisante (Keast and Breslin 2002).

#### **4. MASQUAGE DU GOUT AMER**

Notre but était de masquer le goût amer des composés testés afin d'étudier la toxicité réelle post-ingestion sans la barrière de l'amertume.

Pour des raisons liées à la solubilité des molécules dans la phase lipidique, nous avons choisi comme composé amer l'oleuropéine, afin de le complexer avec de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ lg). Nous avons choisi pour cette partie de l'étude de nous focaliser sur une molécule prise pour modèle, l'oleuropéine, un composé présent dans les feuilles et les fruits de l'olivier. Elle est connue pour être responsable de l'amertume du fruit et de l'huile d'olive. Nous avons cherché à masquer le goût amer de l'oleuropéine en la complexant avec une protéine du lait, la  $\beta$ -lactoglobuline. Celle-ci possède un cœur hydrophobe dans sa structure et est connue pour se lier à différentes molécules, telles que les vitamines ou des lipides. Dans un premier temps, nous avons cherché à nous assurer que la  $\beta$ lg n'interférait pas dans l'appétence d'une solution sucrée. En présence de  $\beta$ lg et de saccharose, les drosophiles sont plus attirées par le mélange que par une simple solution de saccharose. Cette attraction modérée est une bonne chose car si la  $\beta$ lg inhibait la consommation des mouches, il aurait fallu trouver une autre méthode. Cette préférence pour la solution de  $\beta$ lg est conservée aux faibles concentrations d'oleuropéine. Comme la  $\beta$ lg agit comme un tensioactif, il est possible qu'il ne s'agisse pas

d'un effet « gustatif » mais que la baisse de tension superficielle rende mécaniquement plus facile l'ingestion de liquide par les mouches.

Malgré l'interférence de la  $\beta$ lg qui est le véhicule, il faudrait pousser dans cette direction car le masquage de produit amers pourrait permettre de participer à la lutte dans la protection des cultures mais aussi pour administrer des molécules bénéfiques à des insectes. En effet, la plupart des insecticides sont amers et les insectes évitent de les consommer pour ne pas s'empoisonner. En masquant l'amertume, il serait possible de faire des pièges avec des phéromones pour attirer les ravageurs afin qu'ils consomment l'insecticide, tout en limitant leur perception. Ce qui ralentirait le cercle de « vicieux » de l'évitement des substances toxiques. Nous avons même un exemple d'insecte qui a été capable d'évoluer pour éviter un stimulus, même appétant, si les conséquences sont néfastes pour lui (Wada-Katsumata *et al.* 2013; Wada-Katsumata *et al.* 2018).

Comme l'élevage d'insectes est en expansion au court de ces dernières années, il va falloir développer un système pour prévenir ou traiter des futures maladies et épidémies dans les centres. Les principes actifs médicamenteux étant la plupart du temps amers, il va falloir perfectionner un moyen pour pouvoir distribuer le traitement aux insectes et qu'ils le prennent de manière volontaire. Le masquage par complexation ou par encapsulation (par exemples dans des nanoémulsions) peuvent donc être un très bon moyen.

## 5. CONCLUSION GENERALE

Dans ma thèse, nous avons répondu à plusieurs questions. Tout d'abord, nous avons obtenu des résultats qui semblent confirmer l'existence d'une détection post-ingestive de l'escine et de la nicotine, de manière analogue aux observations de Glendinning chez le sphinx du tabac (Glendinning 1996). La démonstration reste cependant incomplète car il n'est pas complètement établi que les mouches ne perçoivent pas la nicotine et l'escine, alors que c'est apparemment le cas pour la nicotine chez les larves de sphinx du tabac. Plusieurs travaux montrent en effet que les drosophiles sont capables de détecter ces deux composés (Weiss *et al.* 2011; Rimal and Lee 2019). Cependant, la sensibilité périphérique des mouches est peut-être plus faible que celle d'autres substances amères comme la quinine ou la berbérine. En utilisant un mutant d'un gène impliqué dans la détection de la caféine et d'autres substances

amères, Gr66a, nous ne sommes pas arrivés à faire un lien entre une intoxication rapide et une absence de perception chez la drosophile.

Grâce à la mesure quantitative de l'alimentation au cours de la vie des individus, nous avons observé que les drosophiles semblent viser à ingérer une quantité de sucres à peu près stable au cours du temps et la quantité de molécules amères leur importe peu, au moins aux concentrations les plus modérées à faibles. Dans notre protocole, nous avons travaillé sur des effectifs relativement restreints (16 à 32) qui ne nous permettent pas d'aborder la variabilité inter-individuelle, que nous n'avons pas pris en compte en travaillant sur la moyenne des individus. Certains individus sont plus sensibles que d'autres à la toxicité mais aussi à l'amertume. Pour pouvoir avoir des données plus propres, il faudrait peut-être rassembler les individus par profils de consommation.

Les conclusions que nous tirons quant à l'absence de lien entre la toxicité et l'amertume des molécules que nous avons testées est cependant difficilement généralisable. En effet, la drosophile est un insecte parmi une multitude d'autres, et même au sein du groupe des drosophiles, il y a des différences énormes de régimes alimentaires et donc potentiellement de mécanismes d'adaptation (McBride 2007; McBride and Arguello 2007; Rane *et al.* 2019). Toutefois, si pour la drosophile, le goût amer n'est pas relié directement à l'évitement des molécules toxiques, il est quand même présent comme signal d'alerte pour l'insecte.

Enfin, nous avons montré que la  $\beta$ lg était appétant chez la drosophile ce qui est un bon point, mais sa présence perturbe aussi la consommation des drosophiles avec des résultats instables. Pour pouvoir améliorer le système, il faudrait peut-être modifier la concentration de la protéine en l'augmentant.

En prenant du recul par rapport aux résultats de la thèse, bien que nous n'arrivions pas à établir un lien direct entre l'amertume et la toxicité chez *Drosophila melanogaster*, nous ne sommes pas les seuls à avoir observé ça. Chez plusieurs espèces d'insectes, Elizabeth Bernays a montré que la plupart des molécules amères n'étaient pas ou très peu toxiques (Bernays 1990; 1991; Bernays and Cornelius 1992). De même, l'existence d'un lien direct a été mis en question chez les mammifères (Glendinning 1994) et Nissim a mis au point un indice de prédiction qui laisse à penser que l'amertume et la toxicité ne sont pas directement liés chez l'homme (Nissim *et al.* 2017).

Alors pourquoi est-ce que nous continuons à supposer que l'amertume est égale à la toxicité ? S'il n'existe pas un lien direct entre l'amertume et la toxicité des molécules, à quoi sert la détection de l'amer ? Bien qu'elle ne corresponde pas à un pattern chimique facilement identifiable, produire des molécules amères est peut-être avantageux comme élément de défense, pour avertir les herbivores et les prédateurs.

Produire un signal d'avertissement (ou signal aposématique) est assez bien décrit chez les proies comme des insectes ou des batraciens. Les proies utilisant l'aposématisme combinent généralement plusieurs signaux comme des odeurs néfastes, des sons brutaux, des couleurs vives ou un goût aversif (Winters *et al.* 2021). Un signal facilement reconnaissable, visuel ou gustatif, permet aux prédateurs d'associer facilement un signal (visible à distance) à une conséquence physiologique (goût amer et intoxication). Des insectes se défendant par un goût amer et des couleurs aposématiques sont bien connus chez les coléoptères comme les coccinelles qui ont une hémolymphe toxique, ou encore chez les chenilles des papillons monarques qui contiennent des cardénolides (Rojas *et al.* 2015). De manière plus générale, selon cette logique, l'amertume des métabolites secondaires des plantes pourrait servir de signal aposématique chimique permettant de tenir les prédateurs à distance. D'où la nécessité d'avoir une signalisation aposématique honnête pour faire tenir l'édifice.



# BIBLIOGRAPHIE GENERALE

---

- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJP, Zuker CS. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702.
- Aerts RJ, Mordue AJ. 1997. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. *J. Chem. Ecol.* 23: 2117-2132.
- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 594-602.
- Al-kasmi B, Alsirawan M, Bashimam M, El-zein H. 2017. Mechanical microencapsulation: The best technique in taste masking for the manufacturing scale - Effect of polymer encapsulation on drug targeting. *J. Control. Release* 260: 134-141.
- Al-Shabib NA, Khan JM, Malik A, Alsenaidy MA, Rehman MT, Alajmi MF, Alsenaidy AM, Husain FM, Khan RH. 2018. Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with beta lactoglobulin: Spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies. *Journal of Molecular Liquids* 269: 511-520.
- Ali Agha M. 2016. Physiologie des récepteurs gustatifs chez la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*). Ecole doctorale Agriculture, Alimentatio, Biologie, Environnement, Santé. Université Paris-Saclay (ComUE). p. 253.
- Alyokhin A, Chen YH. 2017. Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance. *Curr. Opin. Insect Sci.* 21: 33-38.
- Amezian D, Nauen R, Le Goff G. 2021. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects - An overview *Pesticide Biochemistry and Physiology* 174.
- Amrein H, Thorne N. 2005. Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15: R673-684.
- Apostolopoulou AA, Hersperger F, Mazija L, Widmann A, Wust A, Thum AS. 2014. Composition of agarose substrate affects behavioral output of *Drosophila* larvae. *Front. Behav. Neurosci.* 8.
- Ares G, Barreiro C, Deliza R, Gambaro A. 2009. Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Res. Int.* 42: 871-878.
- Ayestaran A, Giurfa M, de Brito Sanchez MG. 2010. Toxic but drunk: Gustatory aversive compounds induce post-ingestional malaise in harnessed honeybees. *PLoS ONE* 5.
- Bachmanov AA, Beauchamp GK. 2007. Taste receptor genes. *Annu. Rev. Nutr.* 27: 389-414.
- Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. 2014. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 18508-18524.
- Barron AB, Maleszka J, Vander Meer RK, Robinson GE, Maleszka R. 2007. Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. *J. Insect Physiol.* 53: 187-194.
- Beauchamp GK. 2016. Why do we like sweet taste: A bitter tale? *Physiol. Behav.* 164: 432-437.

- Beauchamp GK, Jiang P. 2015. Comparative biology of taste: Insights into mechanism and function. *Flavour* 4: 9.
- Beck TK, Jensen S, Bjoern GK, Kidmose U. 2014. The masking effect of sucrose on perception of bitter compounds in *Brassica* vegetables. *J. Sens. Stud.* 29: 190-200.
- Behmer ST, Elias DO, Bernays EA. 1999. Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper. *J. Exp. Biol.* 202: 739-748.
- Behrens M, Meyerhof W. 2006. Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell. Molec. Life Sci.* 63: 1501-1509.
- Belitz H-D, Wieser H. 1985. Bitter compounds: Occurrence and structure-activity relationships. *Food Reviews International* 1: 271-354.
- Benton R, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB. 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136: 149-162.
- Bergvall UA, Leimar O. 2005. Plant Secondary Compounds and the Frequency of Food Types Affect Food Choice by Mammalian Herbivores. *Ecology* 86: 2450-2460.
- Bernays EA. 1990. Plant secondary compounds deterrent but not toxic to the grass specialist acridid *Locusta migratoria*: Implications for the evolution of graminivory. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 53-56.
- Bernays EA. 1991. Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the grasshopper *Schistocerca americana*. *J. Chem. Ecol.* 17: 2519-2526.
- Bernays EA, Augner M, Abbot DK. 1997. A behavioral mechanism for incorporating an unpalatable food in the diet of a generalist herbivore (Orthoptera: Acrididae). *J. Insect Behav.* 10: 841-858.
- Bernays EA, Chapman RF. 1994. *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. London, UK: Chapman and Hall.
- Bernays EA, Chapman RF. 2000. A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths. *J. Insect Physiol.* 46: 905-912.
- Bernays EA, Cornelius M. 1992. Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the alfalfa weevil *Hypera brunneipennis*. *Entomol. Exp. Appl.* 64: 289-292.
- Bernays EA, Oppenheim S, Chapman RF, Kwon H, Gould F. 2000. Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 26: 547-563.
- Bogwitz MR, Chung H, Magoc L, Rigby S, Wong W, O'Keefe M, McKenzie JA, Batterham P, Daborn PJ. 2005. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 102: 12807-12812.
- Bozzolan F, Siaussat D, Maria A, Durand N, Pottier MA, Chertemps T, Maibeche-Coisne M. 2014. Antennal uridine diphosphate (UDP)-glycosyltransferases in a pest insect: diversity and putative function in odorant and xenobiotics clearance. *Insect Mol. Biol.* 23: 539-549.
- Breslin PAS. 1996. Interactions among salty, sour and bitter compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 390-399.
- Breslin PAS, Beauchamp GK. 1995. Suppression of bitterness by sodium: Variation among bitter taste stimuli. *Chem. Senses* 20: 609-623.

- Breslin PAS, Beauchamp GK. 1997. Salt enhances flavour by suppressing bitterness. *Nature* 387: 563-563.
- Brewster ME, Loftsson T. 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 645-666.
- Brownlow S, Morais Cabral JH, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I, North ACT, Sawyer L. 1997. Bovine b-lactoglobulin at 1.8 Å resolution —still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5: 481-495.
- Brun A, Cuany A, LeMouel T, Berge J, Amichot M. 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 697-703.
- Calvino AM, Garcia-Medina MR, Cometto-Muñiz JE. 1990. Interactions in caffeine - sucrose and coffee - sucrose mixtures: evidence of taste and flavor suppression. *Chem. Senses* 15: 505-519.
- Camus MF, Huang CC, Reuter M, Fowler K. 2018. Dietary choices are influenced by genotype, mating status, and sex in *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Evol.* 8: 5385-5393.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJP. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100: 703-711.
- Chang Y-J, Tseng C-Y, Lin P-Y, Chuang Y-C, Chao M-W. 2017. Acute exposure to DEHP metabolite, MEHP cause genotoxicity, mutagenesis and carcinogenicity in mammalian Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 38: 336-345.
- Chapman RF. 1982. Chemoreception - the significance of receptor numbers. *Adv. Insect Physiol.* 16: 247-356.
- Chen YCD, Park SJ, Joseph RM, Ja WW, Dahanukar AA. 2019. Combinatorial pharyngeal taste coding for feeding avoidance in adult *Drosophila*. *Cell Rep.* 29: 961-973.
- Clyne PJ, Warr CG, Carlson JR. 2000. Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* 287: 1830-1834.
- Cocco N, Glendinning JI. 2012. Not all sugars are created equal: some mask aversive tastes better than others in an herbivorous insect. *J. Exp. Biol.* 215: 1412-1421.
- Çömez MS, Cellat M, Özkan H, Borazan Y, Aydın T, Gökçek I, Türk E, Güvenç M, Çakır A, Özsoy SY. 2020. Protective effect of oleuropein on ketamine-induced cardiotoxicity in rats. *Archives of Pharmacology* 393: 1691-1699.
- Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA. 2000. Protective Effect of Oleuropein, an Olive Oil Biophenol, on Low Density Lipoprotein Oxidizability in Rabbits. *Lipids* 35: 45-54.
- Cottee PK, Bernays EA, Mordue AJ. 1988. Comparisons of deterrence and toxicity of selected secondary plant compounds to an oligophagous and a polyphagous acridid. *Entomol. Exp. Appl.* 46: 241-247.
- Coupland JN, Hayes JE. 2014. Physical approaches to masking bitter taste: Lessons from food and pharmaceuticals. *Pharmac. Res.* 31: 2921-2939.
- Cruickshanks KJ, Schubert CR, Snyder DJ, Bartoshuk LM, Huang GH, Klein BEK, Klein R, Nieto FL, Pankow JS, Tweed TS, Krantz EM, Moy GS. 2009. Measuring Taste Impairment in Epidemiologic Studies – The Beaver Dam Offspring Study. *Ann. NY Acad. Sci.* 1170: 543-552.



- Daborn P, Boundy S, Yen J, Pittendrigh B, French-Constant R. 2001. DDT resistance in *Drosophila* correlates with *Cyp6g1* over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Mol. Genet. Genom.* 266: 556-563.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, French-Constant RH. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.
- Dagan-Wiener A, Nissim I, Abu NB, Borgonovo G, Bassoli A, Niv MY. 2017. Bitter or not? BitterPredict, a tool for predicting taste from chemical structure. *Sci. Rep.* 7: 13.
- Dahanukar A, Foster K, van der Goes van Naters WM, Carlson JR. 2001. A *Gr* receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 4: 1182-1186.
- Dahanukar A, Lei Y-T, Kwon JY, Carlson JR. 2007. Two *Gr* genes underlie sugar reception in *Drosophila*. *Neuron* 56: 503-516.
- Dan Q, Xiong W, Liang H, Wu D, Zhan F, Chen Y, Ding S, Li B. 2019. Characteristic of interaction mechanism between  $\beta$ -lactoglobulin and nobiletin: A multi-spectroscopic, thermodynamics methods and docking study. *Food Research International* 120: 255-263.
- David JR. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic conditions. *Drosophila Information Service* 36: 128.
- Davis CJ, Harding RK, Leslie RA, Andrews PLR. 1986. The Organisation of Vomiting as a Protective Reflex. *Nausea and Vomiting : Mechanisms and Treatment*: 65-75.
- de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Herve N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat. Meth.* 9: 690-696.
- de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JRS. 1999. Inhibition of Leukocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgin Olive Oil. *Biochem. Pharmacol.* 57: 445-449.
- Delventhal R, Carlson JR. 2016. Bitter taste receptors confer diverse functions to neurons. *eLife* 5: 23.
- Dermauw W, Van Leeuwen T. 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45: 89-110.
- Deshpande SA, Carvalho GB, Amador A, Phillips AM, Hoxha S, Lizotte KJ, Ja WW. 2014. Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. *Nat. Meth.* 11: 535-540.
- Desor JA, Maller O, Andrews K. 1975. Ingestive responses of human newborns to salty, sour, and bitter stimuli. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89: 966-970.
- Dethier VG. 1976. *The Hungry Fly. A Physiological Study of the Behavior Associated with Feeding.* Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Dimitrijevic N, Dzitoyeva S, Manev H. 2004. An automated assay of the behavioral effects of cocaine injections in adult *Drosophila*. *J. Neurosci. Meth.* 137: 181-184.
- Dinan L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57: 325-339.
- Dunipace L, Meister S, McNealy C, Amrein H. 2001. Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Curr. Biol.* 11: 822-835.

- Durand N, Pottier MA, Siaussat D, Bozzolan F, Maibeche M, Chertemps T. 2018. Glutathione-S-transferases in the olfactory organ of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*, diversity and conservation of chemosensory clades. *Front. Physiol.* 9: 11.
- Ebbs ML, Amrein H. 2007. Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 454: 735-747.
- El-Keredy A, Schleyer M, König C, Ekim A, Gerber B. 2012. Behavioural analyses of quinine processing in choice, feeding and learning of larval *Drosophila*. *PLoS ONE* 7.
- Ewart GD, Howells AJ. 1998. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Meth. Enzymol.* 292: 213-224.
- Feng P, Zheng JS, Rossiter SJ, Wang D, Zhao HB. 2014. Massive losses of taste receptor genes in toothed and baleen whales. *Genome Biol. Evol.* 6: 1254-1265.
- Fibrianto K, Yuwono SS, Hasyati N. 2021. Just about the right analysis of coffee leaves tea bitterness and astringency by modifying brewing temperature and time. *IOP Conference Series : Earth and Environmental Science* 672: 012053.
- French AS, Sellier M-J, Ali Agha M, Guigue AMA, Chabaud M-A, Reeb PD, Mitra A, Grau Y, Soustelle L, Marion-Poll F. 2015. Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 35: 3990-4004.
- Frijters JER, Schifferstein HNJ. 1994. Perceptual interactions in mixtures containing bitter-tasting substances. *Physiol. Behav.* 56: 1243-1249.
- Ganchrow JR, Steiner JE, Daher M. 1983. Neonatal Facial Expressions in Response to Different Qualities and Intensities of Gustatory Stimuli. *Infant Behavior and Development* 6: 476-484.
- Garcia S. 2020. Pandemics and Traditional Plant-Based Remedies. A Historical-Botanical Review in the Era of COVID19. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-9.
- Gaudette NJ, Pickering GJ. 2012. The efficacy of bitter blockers on health-relevant bitterants. *J. Funct. Food.* 4: 177-184.
- Gaudette NJ, Pickering GJ. 2013. Modifying bitterness in functional food systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53: 464-481.
- Geer BW, Olander RM, Sharp PL. 1970. Quantification of Dietary Choline Utilization in Adult *Drosophila Melanogaster* by Radioisotope Methods. *J. Insect Physiol.* 16: 33-43.
- Gelperin A. 1971. Regulation of feeding. *Annu. Rev. Entomol.* 16: 365-378.
- Glendinning JI. 1994. Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiol. Behav.* 56: 1217-1227.
- Glendinning JI. 1996. Is chemosensory input essential for the rapid rejection of toxic foods? *J. Exp. Biol.* 199: 1523-1534.
- Glendinning JI. 2002. How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? *Entomol. Exp. Appl.* 104: 15-25.
- Glendinning JI, Brown H, Capoor M, Davis A, Gbedemah A, Long E. 2001a. A peripheral mechanism for behavioral adaptation to specific "bitter" taste stimuli in an insect. *J. Neurosci.* 21: 3688-3696.
- Glendinning JI, Domdom S, Long E. 2001b. Selective adaptation to noxious foods by a herbivorous insect. *J. Exp. Biol.* 204: 3355-3367.

- Glendinning JI, Ensslen S, Eisenberg ME, Weiskopf P. 1999. Diet-induced plasticity in the taste system of an insect: Localization to a single transduction pathway in an identified taste cell. *J. Exp. Biol.* 202: 2091-2102.
- Gordesky-Gold B, Rivers N, Ahmed OM, Breslin PAS. 2008. *Drosophila melanogaster* prefers compounds perceived sweet by humans. *Chem. Senses* 33: 301-309.
- Gouin A, Bretaudeau A, Nam K, Gimenez S, Aury JM, Duvic B, Hilliou F, Durand N, Montagne N, Darboux I, Kuwar S, Chertemps T, Siaussat D, Bretschneider A, Mone Y, Ahn SJ, Hanniger S, Grenet ASG, Neunemann D, Maumus F, Luyten I, Labadie K, Xu W, Koutroumpa F, Escoubas JM, Llopis A, Maibeche-Coisne M, Salasc F, Tomar A, Anderson AR, Khan SA, Dumas P, Orsucci M, Guy J, Belser C, Alberti A, Noel B, Couloux A, Mercier J, Nidelet S, Dubois E, Liu NY, Boulogne I, Mirabeau O, Le Goff G, Gordon K, Oakeshott J, Consoli FL, Volkoff AN, Fescemyer HW, Marden JH, Luthe DS, Herrero S, Heckel DG, Wincker P, Kergoat GJ, Amselem J, Quesneville H, Groot AT, Jacquin-Joly E, Negre N, Lemaitre C, Legeai F, d'Alencon E, Fournier P. 2017. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Sci. Rep.* 7: 12.
- Hart BL. 1988. Biological Basis of the Behavior of Sick Animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12: 123-137.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, Bernays EA. 2005. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 5: 391-411.
- Henderson MC, Neumann CM, Buhler DR. 1998. Analysis of Denatonium Benzoate in Oregon Consumer Products by HPLC. *Chemosphere* 36: 203-210.
- Hercus MJ, Loeschcke V, Rattan SIS. 2003. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 4.
- Herndon LA, Chapman T, Kalb JM, Lewin S, Partridge L, Wolfner MF. 1997. Mating and hormonal triggers regulate accessory gland gene expression in male *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 43: 1117-1123.
- Hiroi M, Meunier N, Marion-Poll F, Tanimura T. 2004. Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 61: 333-342.
- Hoang Thi TH, Morel S, Ayouni F, Flament M-P. 2012. Development and evaluation of taste-masked drug for paediatric medicines – Application to acetaminophen. *International Journal of Pharmaceutics* 434: 235-242.
- Holen OH. 2013. Disentangling taste and toxicity in aposematic prey. *Proc. Roy. Soc. B* 280: 8.
- Hong W, Zhao HB. 2014. Vampire bats exhibit evolutionary reduction of bitter taste receptor genes common to other bats. *Proc. Roy. Soc. B* 281: 20141079.
- Hosamani R, Muralidhara. 2013. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 83: 25-40.
- Howe GA, Jander G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 41-66.
- Hurst V, Stevenson PC, Wright GA. 2014. Toxins induce 'malaise' behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. A* 200: 881-890.
- Hussain M, Debnath B, Qasim M, Bamisile BS, W. I, Hameed MS, Wang L, Qiu D. 2019. Role of Saponins in Plant Defense Against Specialist Herbivores. *Molecules* 24: 2067.
- Ibanez S, Gallet C, Despres L. 2012. Plant insecticidal toxins in ecological networks. *Toxins* 4: 228-243.

- Itskov PM, Moreira JM, Vinnik E, Lopes G, Safarik S, Dickinson MH, Ribeiro C. 2014. Automated monitoring and quantitative analysis of feeding behaviour in *Drosophila*. *Nat. Comm.* 5: 4560.
- Ja WW, Carvalho GB, Mak EM, de la Rosa NN, Fang AY, Liong JC, Brummel T, Benzer S. 2007. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *PNAS* 104: 8253-8256.
- Jacobs WW, Beauchamp GK, Kare MR. 1978. Progress in Animal Flavor Research. In: Bullard RW, editor Flavor Chemistry of Animal Foods. Washington, DC: American Chemical Society. p. Chapter 1, 1-20.
- Jacobs WWBGKK, M. R. . 1978. Progress in Animal Flavor Research. Flavor Chemistry of Animal Foods 67: 1-20.
- Jiang PH, Josue J, Li X, Glaser D, Li WH, Brand JG, Margolskee RF, Reed DR, Beauchamp GK. 2012. Major taste loss in carnivorous mammals. *PNAS* 109: 4956-4961.
- Jiao Y, Moon SJ, Montell C. 2007. A *Drosophila* gustatory receptor required for the responses to sucrose, glucose, and maltose identified by mRNA tagging. *PNAS* 104: 14110-14115.
- Jost J-P, Jost-Tse Y-C. 2016. Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites (et : quelques applications pratiques).
- Kamen JM, Pilgrim FJ, Gutman NJ, Kroll BJ. 1961. Interactions of suprathreshold taste stimuli. *J. Exp. Psychol.* 62: 348-356.
- Katsuragi Y, Kashiwayanagi M, Kurihara K. 1997. Specific inhibitor for bitter taste: inhibition of frog taste nerve responses and human taste sensation to bitter stimuli. *Brain Res. Protoc.* 1: 292-298.
- Katsuragi Y, Yasumasu T, Kurihara K. 1996. Lipoprotein that selectively inhibits taste nerve responses to bitter substances. *Brain Res.* 713: 240-245.
- Keast RSJ. 2008. Modification of the bitterness of caffeine. *Food. Qual. Prefer.* 19: 465-472.
- Keast RSJ, Canty TM, Breslin PAS. 2004. The Influence of Sodium Salts on Binary Mixtures of Bitter-tasting Compounds. *Chem. Senses* 29: 431-439.
- Keast SJR, Breslin PAS. 2002. An overview of binary taste-taste interactions. *Food. Qual. Prefer.* 14: 111-124.
- Kim SH, Lee Y, Akitake B, Woodward OM, Guggino WB, Montell C. 2010. *Drosophila* TRPA1 channel mediates chemical avoidance in gustatory receptor neurons. *PNAS* 107: 8440-8445.
- Kirkness EF, Haas BJ, Sun WL, Braig HR, Perotti MA, Clark JM, Lee SH, Robertson HM, Kennedy RC, Elhaik E, Gerlach D, Kriventseva EV, Elsik CG, Graur D, Hill CA, Veenstra JA, Walenz B, Tubio JMC, Ribeiro JMC, Rozas J, Johnston JS, Reese JT, Popadic A, Tojo M, Raoult D, Reed DL, Tomoyasu Y, Krause E, Mittapalli O, Margam VM, Li HM, Meyer JM, Johnson RM, Romero-Severson J, VanZee JP, Alvarez-Ponce D, Vieira FG, Aguade M, Guirao-Rico S, Anzola JM, Yoon KS, Strycharz JP, Unger MF, Christley S, Lobo NF, Seufferheld MJ, Wang NK, Dasch GA, Struchiner CJ, Madey G, Hannick LI, Bidwell S, Joardar V, Caler E, Shao RF, Barker SC, Cameron S, Bruggner RV, Regier A, Johnson J, Viswanathan L, Utterback TR, Sutton GG, Lawson D, Waterhouse RM, Venter JC, Strausberg RL, Berenbaum MR, Collins FH, Zdobnov EM, Pittendrigh BR. 2010. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *PNAS* 107: 12168-12173.
- Kojima T, Furuyama A, Isono K, Hamada T, Ohsuga K, Takada S. 2018. Effects of salt taste disorder on behavior and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Oral Biosciences* 60: 15-20.

- Konno A, Misaki M, Toda J, Wada T, Asumatsu KY. 1982. Bitterness Reduction of Naringin and Limonin by B-Cyclodextrin. *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 2203-2208.
- Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. 2004. Invited Review:  $\beta$ -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* 87: 785-796.
- Koul O. 2004. *Insect Antifeedants*. Taylor & Francis.
- Kroeze JHA, Bartoshuk LM. 1985. Bitterness Suppression as Revealed by Split-Tongue Taste Stimulation in Humans. *Physiol. Behav.* 35: 779-783.
- Lai Y, Despouy E, Sandoz JC, Su SK, Sanchez MGD, Giurfa M. 2020. Degradation of an appetitive olfactory memory via devaluation of sugar reward is mediated by 5-HT signaling in the honey bee. *Neurobiol. Learn. Mem.* 173: 13.
- Lambdon PW, Hassall M. 2005. How should toxic secondary metabolites be distributed between the leaves of a fast-growing plant to minimize the impact of herbivory? *Funct. Ecol.* 19: 299-305.
- Lee JC, Bernays EA. 1990. Food tastes and toxic effects: associative learning by the polyphagous grasshopper *Schistocerca americana* (Drury) (Orthoptera: Acrididae). *Anim. Behav.* 39: 163-173.
- Lee Y, Moon SJ, Montell C. 2009. Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*. *PNAS* 106: 4495-4500.
- Lee Y, Moon SJ, Wang YJ, Montell C. 2015. A *Drosophila* gustatory receptor required for strychnine sensation. *Chem. Senses* 40: 525-533.
- Lemaitre B, Miguel-Aliaga I. 2013. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Genet.* 47: 377-404.
- Li DY, Zhang JZ. 2014. Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 31: 303-309.
- Li X, Li W, Wang H, Cao J, Maehashi K, Huang L, Bachmanov AA, Reed DR, Legrand-Defretin Vr, Beauchamp GK, Brand JG. 2005. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet.* 1: e3.
- Li XD, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *PNAS* 99: 4692-4696.
- Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. 2007. Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules* 9: 50-56.
- Liman ER, Zhang YV, Montell C. 2014. Peripheral coding of taste. *Neuron* 81: 984-1000.
- Liu J, Chen Z, Yu L, Xu S, Zhang Y. 2018. Effects of Plants Secondary Metabolite Nicotine on Growth and Development of *Frankliniella occidentalis*. *Plant Diseases and Pest* 9: 21-24.
- Magwere T, Chapman T, Partridge L. 2004. Sex Differences in the Effect of Dietary Restriction on Life Span and Mortality Rates in Female and Male *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES* 59: 3-9.
- Malbert-Colas A, Drozd T, Massot M, Bagni T, Chertemps T, Maria A, Mabche M, Siaussat D. 2020. Effects of low concentrations of deltamethrin are dependent on developmental stages and sexes in the pest moth *Spodoptera littoralis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27: 41893-41901.
- Marion-Poll F. 2020a. The Gustatory System in Insects. In: Fritzsche B, Meyerhof W, editors, *The Senses. A Comprehensive Reference*. Volume 3. Elsevier. p. 148-168.

- Marion-Poll F. 2020b. MultiCAFE. <http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/multicafe/>.
- Marion-Poll F, Calas D, Darazy-Choubaya D, Faucher C, Descoins C. 2009. Tasting toxicants as bitter: phytoecdysteroids. In: Newland PL, Cobb M, Marion-Poll F, editors, Insect Taste. Taylor & Francis. p. 127-138.
- Martin Del Valle EM. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39: 1033-1046.
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404: 601-+.
- Mattes RD. 2007. Effects of linoleic acid on sweet, sour, salty, and bitter taste thresholds and intensity ratings of adults. *Am. J. Physiol. - GLP* 292: G1243-1248.
- McBride CS. 2007. Rapid evolution of smell and taste receptor genes during host specialization in *Drosophila sechellia*. *PNAS* 104: 4996-5001.
- McBride CS, Arguello JR. 2007. Five *Drosophila* genomes reveal nonneutral evolution and the signature of host specialization in the chemoreceptor superfamily. *Genetics* 177: 1395-1416.
- Mennella JA, Reed DR, Mathew PS, Roberts KM, Mansfield CJ. 2015. "A spoonful of sugar helps the medicine go down": Bitter masking by sucrose among children and adults. *Chem. Senses* 40: 17-25.
- Mensi A, Choiset Y, Rabesona H, Haertlé T, Borel P, Chobert J-M. 2013. Interactions of  $\beta$ -Lactoglobulin Variants A and B with Vitamin A. Competitive Binding of Retinoids and Carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 61: 4114-4119.
- Merzendorfer H. 2014. ABC transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites. *Adv. Insect Physiol.* 46: 1-72.
- Meunier N, Marion-Poll F, Rospars JP, Tanimura T. 2003. Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 56: 139-152.
- Millman ST. 2007. Sickness behaviour and its relevance to animal welfare assessment at the group level. *Animal Welfare* 16: 123-125.
- Minnich DE. 1921. An experimental study of the tarsal chemoreceptors of two nymphalid butterflies. *J. Exp. Zool.* 33: 172-203.
- Mitchell BK, Itagaki H, Rivet MP. 1999. Peripheral and central structures involved in insect gustation. *Microsc. Res. Tech.* 47: 401-415.
- Molina Ortiz SE, Mauri A, Monterrey-Quintero ES, Trinadade MA, Santana AS, Favaro-Trinidad CS. 2009. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology* 42: 919-923.
- Montell C. 2009. A taste of the *Drosophila* gustatory receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19: 345-353.
- Moon SJ, Kottgen M, Jiao YC, Xu H, Montell C. 2006. A taste receptor required for the caffeine response *in vivo*. *Curr. Biol.* 16: 1812-1817.
- Moon SJ, Lee Y, Jiao Y, Montell C. 2009. A *Drosophila* gustatory receptor essential for aversive taste and inhibiting male-to-male courtship. *Curr. Biol.* 19: 1623-1627.
- Morris M, Shaw A, Lambert M, Perry HH, Lowenstein E, Valenzuela D, Velazquez-Ulloa NA. 2018. Developmental nicotine exposure affects larval brain size and the adult dopaminergic system of *Drosophila melanogaster*. *BMC Dev. Biol.* 18: 15.

- Mullin CA, Chyb S, Eichenseer H, Hollister B, Frazier JL. 1994. Neuroreceptor mechanisms in insect gustation - a pharmacological approach. *J. Insect Physiol.* 40: 913-931.
- Muñoz IJ, Schilman PE, Barrozo RB. 2020. Impact of alkaloids in food consumption, metabolism and survival in a blood-sucking insect. *Sci. Rep.* 10: 10.
- Murphy KR, Park JH, Huber R, Ja WW. 2017. Simultaneous measurement of sleep and feeding in individual *Drosophila*. *Nat. Protoc.* 12: 2355-2366.
- Nakata K, Tanaka Y, Nakano T, Adachi T, Tanaka H, Kaminuma T, Ishikawa T. 2006. Nuclear Receptor-Mediated Transcriptional Regulation in Phase I, II, and III Xenobiotic Metabolizing Systems. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21: 437-457.
- Nebert DW, Dalton TP. 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews - Cancer* 6: 947-960.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng LX, Zhao G, Ryba NJP, Zuker CS. 2002. An amino acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390.
- Nishida R, Fukami H. 1990. Sequestration of distasteful compounds by some pharmacophagous insects. *J. Chem. Ecol.* 16: 151-164.
- Nissim I, Dagan-Wiener A, Niv MY. 2017. The taste of toxicity: A quantitative analysis of bitter and toxic molecules. *IUBMB Life* 69: 938-946.
- Niven JE, Laughlin SB. 2008. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J. Exp. Biol.* 211: 1792-1804.
- Oliveira Neves IC, Teles de Faria J, Teixeira Ribeiro Vidigal MC, Cardoso Fidelis P, Rodrigues Minim VP, Minim LA. 2018. Foaming properties of suspensions composed by  $\beta$ -lactoglobulin and polysaccharides, in the presence of sucrose or polyols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 550: 199-208.
- Pacheco AG, Rebelo MD. 2013. A simple R-based function to estimate lethal concentrations. *Marine Environmental Research* 91: 41-44.
- Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. 2015. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 9: 293-304.
- Painter RH. 1951. Insect Resistance in Crop Plants. *Soil Science* 72.
- Paiva-Martins F, Rodrigues V, Calheiros R, Marques MPM. 2011. Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods. *J. Sci. Food Agric.* 91: 309-314.
- Ponton F, Morimoto J, Robinson K, Kumar SS, Cotter SC, Wilson K, Simpson SJ. 2020. Macronutrients modulate survival to infection and immunity in *Drosophila*. *J. Anim. Ecol.* 89: 460-470.
- Pripp AH, Busch J, Vreeker R. 2004. Effect of viscosity, sodium caseinate and oil on bitterness perception of olive oil phenolics. *Food. Qual. Prefer.* 15: 375-382.
- Rane RV, Clarke DF, Pearce SL, Zhang GJ, Hoffmann AA, Oakeshott JG. 2019. Detoxification genes differ between cactus-, fruit-, and flower-feeding *Drosophila*. *J. Hered.* 110: 80-91.
- Rich JT, Neely JG, Paniello RC, Voelker CCJ, Nussenbaum B, Wang EW. 2010. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 143: 331-336.

- Rimal S, Lee Y. 2019. Molecular sensor of nicotine in taste of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 111: 7.
- Ro J, Harvanek ZM, Pletcher SD. 2014. FLIC: High-throughput, continuous analysis of feeding behaviors in *Drosophila*. *PLoS ONE* 9: e101107.
- Robertson HM, Baits RL, Walden KKO, Wada-Katsumata A, Schal C. 2018. Enormous expansion of the chemosensory gene repertoire in the omnivorous German cockroach *Blattella germanica*. *J. Exp. Zool. Part B* 330: 265-278.
- Rohwedder A, Pfitzenmaier JE, Ramsperger N, Apostolopoulou AA, Widmann A, Thum AS. 2012. Nutritional value-dependent and nutritional value-independent effects on *Drosophila melanogaster* larval behavior. *Chem. Senses* 37: 711-721.
- Rojas B, Valkonen J, Nokelainen O. 2015. Aposematism. *Curr. Biol.* 25: R350-R351.
- Rudra S, Jana A, Sepay N, Patel BK, Mahapatra A. 2018. Characterization of the binding of strychnine with bovine b-lactoglobulin and human lysozyme using spectroscopic, kinetic and molecular docking analysis. *New Journal of Chemistry* 42: 8615-8628.
- Sang J, Rimal S, Lee Y. 2019. Gustatory receptor *28b* is necessary for avoiding saponin in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Rep.* 20: 12.
- Sasha B, Leibowitz J. 1961. On the Oleuropein, the Bitter Principle of Olives. *J. Org. Chem.* 26: 1948-1954.
- Schiffman SS, Gatlin LA, Sattely-Miller EA, Graham BG, Heiman SA, Stagner WC, Erickson RP. 1994. The Effect of Sweeteners on Bitter Taste in Young and Elderly Subjects. *Brain Res. Bull.* 35: 189-204.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJ, Dicke M. 2005. *Insect-Plant Biology*. OUP Oxford.
- Schuler MA, Berenbaum MR. 2013. Structure and function of cytochrome P450s in insect adaptation to natural and synthetic toxins: Insights gained from molecular modeling. *J. Chem. Ecol.* 39: 1232-1245.
- Scott K. 2005. Taste recognition: Food for thought. *Neuron* 48: 455-464.
- Scott K, Brady R, Jr., Cravchik A, Morozov P, Rzhetsky A, Zuker C, Axel R. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104: 661-673.
- Sellier M-J, Reeb P, Marion-Poll F. 2011. Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chem. Senses* 36: 323-334.
- Servant G, Tachdjian C, Li XD, Karanewsky DS. 2011. The sweet taste of true synergy: positive allosteric modulation of the human sweet taste receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 32: 631-636.
- Shim J, Lee Y, Jeong YT, Kim Y, Lee MG, Montell C, Moon SJ. 2015. The full repertoire of *Drosophila* gustatory receptors for detecting an aversive compound. *Nature Communication* 6.
- Silva-Soares NF, Nogueira-Alves A, Beldade P, Mirth CK. 2017. Adaptation to new nutritional environments: larval performance, foraging decisions, and adult oviposition choices in *Drosophila suzukii*. *BMC Ecology* 17: 13.
- Simoës PMV, Ott SR, Niven JE. 2012. A long-latency aversive learning mechanism enables locusts to avoid odours associated with the consequences of ingesting toxic food. *J. Exp. Biol.* 215: 1711-1719.



- Simpson SJ, Raubenheimer D. 1996. Feeding behaviour, sensory physiology and nutrient feedback: A unifying model. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 55-64.
- Singer MS, Bernays EA, Carrière Y. 2002. The interplay between nutrient balancing and toxin dilution in foraging by a generalist insect herbivore. *Anim. Behav.* 64: 629-643.
- Singh V, Murphy NR, Balasubramanian V, Mainland JD. 2019. Competitive binding predicts nonlinear responses of olfactory receptors to complex mixtures. *PNAS* 116: 9598-9603.
- Slone J, Daniels J, Amrein H. 2007. Sugar receptors in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17: 1809-1816.
- Sorensen JG, Sarup P, Kristensen TN, Loeschcke V. 2008. Temperature-Induced Hormesis in *Drosophila*. *Mild Stress and Healthy Aging*: 65-79.
- Steiner C, Bozzolan F, Montagné N, Maibèche M, Chertemps T. 2017. Neofunctionalization of “Juvenile Hormone Esterase Duplication” in *Drosophila* as an odorant-degrading enzyme towards food odorants. *Sci. Rep.* 7: 12629.
- Stocker RF. 1994. The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster* - a review. *Cell Tissue Res.* 275: 3-26.
- Stoffolano JG, Jr., Haselton AT. 2013. The adult Dipteran crop: a unique and overlooked organ. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 205-225.
- Sung HY, Jeong YT, Lim JY, Kim H, Oh SM, Hwang SW, Kwon JY, Moon SJ. 2017. Heterogeneity in the *Drosophila* gustatory receptor complexes that detect aversive compounds. *Nat. Comm.* 8: 10.
- Szejtli J, Szente L. 2005. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61: 115-125.
- Szentesi A, Bernays EA. 1984. A study of behavioral habituation to a feeding deterrent in nymphs of *Schistocerca gregaria*. *Physiol. Entomol.* 9: 329-340.
- Tanimura T, Isono K, Takamura T, Shimada I. 1982. Genetic dimorphism in the taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* 147: 433-437.
- Tenney K, Hayes J, Euston S, Elias R, Coupland JN. 2017. Binding of Caffeine and Quinine by Whey Protein and the Effect on Bitterness. *J. Food Sci.* 82: 509-516.
- Terreaux C, Polasek J, Hostettmann K. 2003. Plant Constituents with Hormonal Effects. *Current Organic Whemistry* 7: 1151-1161.
- Thorne N, Chromey C, Bray S, Amrein H. 2004. Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14: 1065-1079.
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189-198.
- Timasheff SN. 1993. The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvent Affect These Processes? *Annual Review in Biophysical and Biomolecular Structure* 22: 67-97.
- Torregrossa AM, Azzara AV, Dearing MD. 2012. Testing the diet-breadth trade-off hypothesis: differential regulation of novel plant secondary compounds by a specialist and a generalist herbivore. *Oecologia* 168: 711-718.
- Tu C-P, Akgül B. 2005. *Drosophila* Glutathione S-Transferases. *Meth. Enzymol.* 401: 204-226.

- Tuck KL, Hayball PJ. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 636-644.
- Ueno K, Ohta M, Morita H, Mikuni Y, Nakajima S, Yamamoto K, Isono K. 2001. Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene *Gr5a*. *Curr. Biol.* 11: 1451-1455.
- Usher BF, Bernays EA, Barbehenn RV, Wrubel RP. 1989. Oral dosing of insects with feeding deterrent compounds. *Entomol. Exp. Appl.* 52: 119-133.
- Vanaei S, Parizi MS, Abdolhosseini S, Katouzian I. 2020. Spectroscopic, molecular docking and molecular dynamic simulation studies on the complexes of  $\beta$ -lactoglobulin, safranal and oleuropein. *Int. J. Biol. Macromol.* 165: 2326-2337.
- Ventura AK, Worobey J. 2013. Early influences on the development of food preferences. *Curr. Biol.* 23: R401-R408.
- Wada-Katsumata A, Robertson HM, Silverman J, Schal C. 2018. Changes in the peripheral chemosensory system drive adaptive shifts in food preferences in insects. *Front. Cell. Neurosci.* 12: 7.
- Wada-Katsumata A, Silverman J, Schal C. 2013. Changes in taste neurons support the emergence of an adaptive behavior in cockroaches. *Science* 340: 972-975.
- Wang R, Liu Y, Hu X, Pan J, Gong D, Zhang G. 2019. New insights into the binding mechanism between osthole and  $\beta$ -lactoglobulin: Spectroscopic, chemometrics and docking studies. *Food Res. Int.* 120: 226-234.
- Weiss LA, Dahanukar A, Kwon JY, Banerjee D, Carlson JR. 2011. The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* 69: 258-272.
- Whitney G, Maggio JC, Harder D. 1990. Manifestations of the major gene influencing sucrose octaacetate (SOA) tasting among mice: classic taste qualities. *Chem. Senses* 15: 243-252.
- Wilkie LM, Phillips EDC. 2014. Heterogeneous binary interactions of taste primaries: Perceptual outcomes, physiology, and future directions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 47: 70-86.
- Winters AE, Lommi J, Kirvesoja J, Nokelainen O, Mappes J. 2021. Multimodal Aposematic Defenses Through the Predation Sequence. *Front. Ecol. Evol.* 9: 657740.
- Wright GA, Mustard JA, Simcock NK, Ross-Taylor AAR, McNicholas LD, Popescu A, Marion-Poll F. 2010. Parallel reinforcement pathways for conditioned food aversions in the honeybee. *Curr. Biol.* 20: 2234-2240.
- Wrubel RP, Bernays EA. 1990a. Effects of ingestion of some non-host plant secondary compounds on larvae of *Manduca sexta*. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 125-130.
- Wrubel RP, Bernays EA. 1990b. The relative insensitivity of *Manduca sexta* larvae to non-host plant secondary compounds. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 117-124.
- Xu C, Li CY-T, Kong A-NT. 2005. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics *Archives of Pharmacal Research* 28: 249-268.
- Xu W, Papanicolaou A, Zhang HJ, Anderson A. 2016. Expansion of a bitter taste receptor family in a polyphagous insect herbivore. *Sci. Rep.* 6: 10.
- Yang J, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, French-Constant RH, Dow JAT. 2007. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics* 30: 223-231.

- Yapici N, Cohn R, Schusterreiter C, Ruta V, Vosshall Leslie B. 2016. A taste circuit that regulates ingestion by integrating food and hunger signals. *Cell* 165: 715-729.
- Yildiz D. 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* 43: 619-632.
- Younus F, Fraser NJ, Coppin CW, Liu JW, Correy GJ, Chertemps T, Pandey G, Maibeche M, Jackson CJ, Oakeshott JG. 2017. Molecular basis for the behavioral effects of the odorant degrading enzyme Esterase 6 in *Drosophila*. *Sci. Rep.* 7: 12.
- Zhang HJ, Faucher CP, Anderson A, Berna AZ, Trowell S, Chen QM, Xia QY, Chyb S. 2013a. Comparisons of contact chemoreception and food acceptance by larvae of polyphagous *Helicoverpa armigera* and oligophagous *Bombyx mori*. *J. Chem. Ecol.* 39: 1070-1080.
- Zhang YV, Raghuwanshi RP, Shen WL, Montell C. 2013b. Food experience-induced taste desensitization modulated by the *Drosophila* TRPL channel. *Nat. Neurosci.* 16: 1468-1476.
- Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266.
- Zhao HB, Zhou YY, Pinto CM, Charles-Dominique P, Galindo-Gonzalez J, Zhang SY, Zhang JZ. 2010. Evolution of the sweet taste receptor gene *Tas1R2* in bats. *Mol. Biol. Evol.* 27: 2642-2650.
- Zhu F, Moural TW, Nelson DR, Palli SR. 2016. A specialist herbivore pest adaptation to xenobiotics through up-regulation of multiple Cytochrome P450s. *Sci. Rep.* 6: 10.





**Titre :** Modulation de la prise de nourriture par des molécules amères chez *Drosophila melanogaster*.

**Mots clés :** Amertume, toxicité, multiCAFE, *Drosophila melanogaster*, consommation

**Résumé :** Les insectes, comme les autres animaux, sont dotés d'un système gustatif qui leur permet d'analyser les molécules sapides présentes dans leurs aliments, comme des sucres (qui stimulent l'alimentation) ou bien des molécules amères (qui l'inhibent). L'amertume est généralement considérée comme permettant à l'animal d'éviter d'ingérer des substances toxiques. L'amertume d'un composé est testée la plupart du temps en mélangeant un composé potentiellement amer à un aliment et en mesurant la quantité consommée en conditions de choix ou de non-choix. Un tel type de protocole ne permet cependant pas de distinguer entre les effets liés à l'amertume proprement dite de ceux qui sont liés à la toxicité.

Dans cette thèse, nous avons essayé d'évaluer si l'amertume était liée à la toxicité, en étudiant les réponses alimentaires et la survie de *Drosophila melanogaster* vis-à-vis de 7 molécules, choisies pour leur amertume et leur toxicité (quinine, berbérine, benzoate de dénatonium, paraquat, nicotine, escine, caféine). Afin de quantifier le comportement alimentaire, nous avons d'abord établi un protocole de mesure semi-automatique du volume de liquide ingéré par des mouches individuelles. Lorsque ces mouches ont le choix entre un liquide sucré et un liquide contenant une substance amère, nous avons pu observer que les mouches diminuaient leur

consommation avec la concentration en molécule amère, et que cette réduction de consommation pouvait également impacter la consommation de solution sucrée. Nous avons également évalué l'impact de ces molécules sur la durée de vie des mouches, lorsqu'elles sont mélangées au milieu alimentaire (liquide ou agar), ou injectée dans l'abdomen de l'animal. Nous avons pu constater que la durée de vie des mouches était fortement corrélée à la quantité de molécules de sucre ingérées plus qu'à la quantité de molécules amères. L'ensemble de ces résultats suggère que l'amertume des molécules inhibe fortement l'alimentation des insectes, plus que la toxicité proprement dite. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à la possibilité de masquage de l'amertume d'une molécule modèle, l'oleuropéine qui est le principal composé de l'amertume de l'huile d'olive, par interaction avec une protéine laitière, la  $\beta$ -lactoglobuline. L'efficacité du masquage de l'amertume a été évaluée par consommation de mélange oleuropéine/ $\beta$ -lactoglobuline par les mouches. L'amertume de l'oleuropéine semble être masquée par la protéine pour des concentrations en oleuropéine inférieures ou égales à 0,1mM.

**Title :** Food intake modulation by bitter molecules in *Drosophila melanogaster*.

**Keywords :** Bitterness, toxicity, multiCAFE, *Drosophila melanogaster*, consumption

**Abstract :** Insects, like other animals, have a gustatory system that allows them to analyze palatable molecules present in their food, like sugars (which stimulate feeding) or bitter molecules (which inhibit it). Bitterness is generally considered as a warning signal for the animal not to ingest a toxic substance. The bitterness of a compound is tested, most of the time, by mixing the compound to food and by measuring the quantity consumed in choice or no choice conditions. However, such a protocol does not permit to distinguish the effects link to bitterness from those linked to toxicity.

In this thesis, we tried to assess whether bitterness is linked to toxicity, by studying feeding response and survival of *Drosophila melanogaster* towards 7 molecules, chosen for their bitterness and their toxicity (quinine, berberine, denatonium benzoate, paraquat, caffeine, nicotine and escin). In order to quantify feeding behavior, we first established a semi-automated protocol to measure the volume of liquid ingested by individual flies. When flies have the choice between a sugar solution and a bitter solution, we observe

that the flies decreased their consumption with the concentration of bitter molecule, and that reduction in consumption could also impact the consumption of sugar solution. We also evaluated the impact of these molecules on the lifespan of the flies, when they are mixed in a nutritive source (agar or liquid), or when they are injected into the abdomen of the insect. We saw that the lifespan of the flies was strongly correlated to the quantity of sugar molecules ingested even more than by the concentration of bitter molecules. These results suggest that the bitterness of molecules strongly inhibits the insects' food intake, more than the proper toxicity. We further investigated masking the bitterness of a model molecule, oleuropein, which is the principal bitter compound in olive oil, by interaction with a whey protein,  $\beta$ -lactoglobulin. The masking efficiency was evaluated by the consumption of a mixture oleuropein/ $\beta$ -lactoglobulin. The bitterness of oleuropein appears to be hidden by the protein for oleuropein's concentrations less or equal to 0.1mM.