



HAL
open science

MND, un transporteur d'acides aminés, acteur clef de la réponse neuronale aux acides aminés des corps pédonculés, chez l'adulte *Drosophila melanogaster*

Julie Delescluse

► To cite this version:

Julie Delescluse. MND, un transporteur d'acides aminés, acteur clef de la réponse neuronale aux acides aminés des corps pédonculés, chez l'adulte *Drosophila melanogaster*. Neurosciences. Université Bourgogne Franche-Comté, 2024. Français. NNT : 2024UBFCK029 . tel-04747646

HAL Id: tel-04747646

<https://theses.hal.science/tel-04747646v1>

Submitted on 22 Oct 2024

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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE DE
BOURGOGNE**

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

École doctorale n°554
Environnement-Santé, Dijon

Doctorat de Neurobiologie

Par
Julie DELESCLUSE

**MINIDISCS, un transporteur d'acides aminés, acteur clef de
la réponse aux acides aminés des corps pédonculés
chez *Drosophila melanogaster*.**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 27 juin 2024.

Composition du Jury :

Mme Leloup-Amiot Corinne	Pr. des Universités, Univ. Bourgogne	Présidente du Jury
Mme Parmentier Marie-Laure	Directrice de recherche, INSERM	Rapporteuse
Mr Royet Julien	Pr. des Universités, Univ. d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Trannoy Séverine	Chargée de recherche, CNRS	Examinatrice
Mr Birman Serge	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
Mr Manière Gérard	Pr. des Universités, Univ. Bourgogne	Codirecteur de thèse
Mr Grosjean Yaël	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse

À mes grands-pères

Remerciements

Mes remerciements sont en premier lieu destinés aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail, Dr. Marie-Laure Parmentier, Pr. Julien Royet, Dr. Séverine Trannoy et Dr. Serge Birman. Mes remerciements s'adressent également aux membres de mon comité de suivi de thèse, Dr. Birman et Dr. Giangrande, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour les recommandations éclairées qu'ils ont su me prodiguer.

Je remercie mon directeur d'équipe et de thèse, le Dr. Yaël Grosjean, de m'avoir acceptée au sein de son équipe, pour son calme et ses discussions avisées. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon codirecteur de thèse, le Pr. Gérard Manière, pour m'avoir soutenue en toutes circonstances. Pour sa bienveillance, sa disponibilité et la liberté de recherche qu'il m'a accordé, ainsi que sa patience qui a été mise à rude épreuve ! Ses précieux conseils, ainsi que ses critiques constructives, ont été essentielles à la construction et la poursuite de mon projet de recherche.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement tous mes collègues de l'équipe « Perception sensorielle : interaction glie/neurone » sans qui ce projet n'aurait pas abouti. Avec des mentions spéciales ! Je remercie Georges pour toutes ces discussions scientifiques (ou non !) très instructives qui m'ont permis d'avancer et de débloquent des points critiques. Un grand merci à Dehbia qui m'a soutenue et apporté plein de petites attentions qui ont su me redonner le sourire. Merci à Martine d'avoir pris le temps de m'aider lorsque j'en avais besoin. Je remercie Amandine et Serge pour avoir assouvi toutes mes demandes spécifiques, pour leur précieuse aide dans la gestion des tubes de comportement que j'ai utilisés, usés et parfois cassés. Je remercie Sylvie pour son aide à l'analyse des expériences de comportement, sans qui ma thèse aurait duré bien plus longtemps. Je remercie Taghrid d'avoir contribué à l'optimisation d'expériences et sa profonde gentillesse. Même si nous nous sommes peu côtoyées, je remercie Cindy pour son aide dans la prise en main des outils indispensables à l'étude du comportement des drosophiles, ainsi que Kadija pour ces remarques scientifiques pertinentes. En somme, un grand merci à tous mes collègues qui m'ont beaucoup apporté, aussi bien scientifiquement qu'humainement. Je remercie toutes les personnes au sein du CSGA qui ont contribué à l'évolution de mon projet, de près ou de loin, particulièrement Doriane pour son temps, ses précieux conseils ainsi que son enthousiasme et sa bienveillance. Ainsi que Claire pour ses conseils techniques et sa patience.

Un merci particulier à tous mes collègues doctorants pour les discussions enrichissantes et l'entraide qui ont jalonné mon parcours. Jeanne, Juliette, Manon, Logan, Izia, JB, ma thèse aurait été impossible sans vous. Vous m'avez épaulé, aidé, soutenu et contribué largement à la finalisation de cette thèse ! Tous nos moments partagés, au labo, à la cafétéria ou ailleurs, tous nos fous rires ont rendu mon quotidien encore plus agréable et m'ont permis d'aller jusqu'au bout. J'espère que nos routes scientifiques et amicales continueront de se croiser.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants. J'espère que vous serez fiers du travail accompli. Jo, notre amitié a commencé au détour du microscope et a grandi dans la ville de Dijon que tu m'as fait découvrir. À la rencontre des Dijonnais avec qui des liens forts se sont créés. Imane, mon infirmière préférée, ton sourire, ta bonne humeur, ta bienveillance, et tous nos moments partagés sont inoubliables ! Et Thibaut, entre bières et jeux de sociétés, nous nous sommes entendus à merveille. Mon départ de Dijon ne nous empêchera pas d'organiser de nouveaux week-ends ensemble!

Et non des moindres, je remercie toutes les drosophiles qui ont donné de leur « personne » pour mes expériences.

Sommaire

Remerciements	3
Table des Abréviations	8
Index des figures	11
Index des tableaux	16
Chapitre 1	17
<i>Introduction</i>	
1. Les acides aminés (AAs)	19
A. Généralités concernant les acides aminés	19
B. Rôles des AAs sur la physiologie et le système nerveux	20
2. Les transporteurs transmembranaires d'acides aminés	22
A. Les Solute carrier (SLC)	23
a. Les transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs).....	25
b. Les transporteurs d'acides aminés neutres (LATs)	25
c. Les transporteurs d'acides aminés hétérodimériques (HATs) de type SLC3A/SLC7A	26
c1. Chaîne lourde de HATs chez <i>Drosophila</i>	27
c2. Chaîne légère de HATs chez <i>Drosophila</i>	27
B. Activation de voies intracellulaires par les AAs	30
C. Les maladies associées à LAT1 (SLC3A2/SLC7A5)	32
3. Le système nerveux central (SNC) chez <i>Drosophila</i>	33
A. Corps pédonculés (CPs)	35
a. Modulation des CPs par les neurones dopaminergiques (DANs)	39
b. Neurones de sortie des CPs : les MBONs	40
c. Implication des différentes KCs dans les processus cognitifs	41
4. Les comportements sociaux	43
A. L'attraction sociale	43
B. Le comportement d'agressivité	44
a. Les dérivés d'AAs, les CPs et la régulation de l'agressivité	45
b. Régulation de l'agressivité par le système chimio sensoriel	46
c. Impact de l'isolement social sur l'agressivité	47
d. Régulation de l'agressivité par le statut nutritionnel	47
e. L'implication de la mémoire et l'apprentissage.....	48
f. Implication de SLC dans l'agressivité	48
<i>Objectifs de la thèse</i>	50

Chapitre 252

Matériel et Méthodes

1. Le modèle <i>Drosophila melanogaster</i>	54
A. Entretien des lignées de <i>Drosophila melanogaster</i>	54
B. Outils génétiques	54
a. Le système d'ARN interférent	54
b. Le système Gal4/UAS	55
c. Le système LexA/LexAop	56
d. L'intersection d'expression génétique	57
C. Les différentes lignées <i>Drosophila melanogaster</i> utilisées	58
2. Analyses transcriptionnelles	62
A. Extraction d'ARNs totaux et digestion DNase I	62
B. Rétrotranscription (RT)	63
C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	63
D. PCR quantitative (qPCR)	65
3. Immunohistochimie sur cerveaux <i>in toto</i>	66
A. Dissection et immunomarquage	66
B. Acquisition par microscopie confocale	67
C. Traitement des images	68
4. Analyses bio-informatiques d'expression génétique	68
5. Imagerie calcique fonctionnelle sur cerveaux <i>ex vivo</i>	68
A. Protocole d'acquisition de l'activité des neurones	69
B. Traitement des données d'imagerie calcique	70
6. Tests de comportements sociaux chez <i>Drosophila melanogaster</i>	71
A. Préparation des individus	71
B. Test de comportement d'agressivité	72
C. Traitement des données	74
D. Test de comportement d'espacement social	74

Chapitre 377

Résultats

Partie 1

1. Profil d'expression de <i>mnd</i> et localisation de MND dans le cerveau	79
2. Profil d'expression de <i>mnd</i> ²⁴⁻¹ dans les CPs.	86
3. Fonction de MND dans les neurones α/β des CPs	99
4. MND et les comportements gouvernés par les CPs	105

A. Calibration des tests de comportement d'agressivité	105
B. Le comportement d'agressivité	107
C. L'espacement social	112
Conclusion et discussion (Partie 1)	113
Partie 2	119
Introduction	120
1. Les récepteurs au glutamate	121
A. Récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs)	121
B. Récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluRs)	122
a. Les NMDA récepteurs (NMDARs)	122
b. Les récepteurs Kainates (KAs)	123
c. Les récepteurs AMPAs	124
d. Les récepteurs GluCl α	124
2. Les récepteurs au glutamate exprimés dans les CPs	125
Résultats	127
1. Identification des récepteurs au glutamate exprimés communément avec <i>mnd</i> ²⁴⁻¹ au sein des KCs	128
A. La sous-unité 1 des récepteurs NMDA (<i>NmdaR1</i>)	129
B. La sous-unité 2 des récepteurs NMDA (<i>NmdaR2</i>)	135
C. La sous-unité <i>KaiR1D</i> des récepteurs Kainates	139
D. Le récepteur métabotrope <i>mGluR</i>	141
E. Le récepteur ionotrope <i>GluClα</i>	143
2. Implication des récepteurs au glutamate dans l'activité dépendante de MND des KC α/β	145
A. Les récepteurs au glutamate	145
B. Les récepteurs NMDA (NMDARs)	146
C. Implication de MND dans la réponse au NMDA	150
3. Glutamate et les KC α/β dans le comportement d'agressivité	153
Conclusion et discussion (Partie 2)	163
Discussion générale et perspectives	169
Références bibliographiques	175
Annexes	190

Table des abréviations

5HT-PLP : Neurones sérotoninergiques localisés dans le protocerebrum latéral postérieur
5HT1A : Récepteur à la sérotonine de type 1A
7T : (z)-7-tricosene
AAs : Acides aminés
AC : Adenylate cyclase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AMPA : Récepteur au glutamate de type AMPA
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APL : Anterior paired lateral
ARM : Mémoire résistante à l'anesthésie
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : Acide ribonucléique messenger
AstA : Allatostatin A
ATP : Adénosine triphosphate
attp2 : site d'insertion génétique localisé sur le chromosome 3
attP40 : site d'insertion génétique localisé sur le chromosome 2
BCAAs : Acide aminé ramifiés
BCH : 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid
BHE : Barrière hématoencéphalique
Blast : Alignement de séquences nucléotidiques
CA : Calice des corps pédonculés
CAT : Cationic Amino acid Transporter
CD98hc : CD98 heavy chain
Cellule S2 : Cellule de drosophile en culture
ChAT : Choline acetyltransferase
ChIP : Chromatine immuno précipitation
CoIP : Co Immunoprécipitation
CPs : Corps Pédonculés
cVA : 11-*cis*-Vaccenyl Acétate
dACA : Calice accessoire dorsal des corps pédonculés
DAG : Diacylglycerol
DAN : Neurone dopaminergique
DH44+ : Neurones exprimant la Diuretic Hormone 44
DILP : *Drosophila* Insulin Like Peptide
DL : Diode laser
Dnc : Phosphodiesterase Duncce
DVGLUT : Transporteur vésiculaire de glutamate de drosophile
EAs : Acides aminés Essentiels
EB : corps ellipsoïde
FAAs : Acides aminés Fonctionels
FB : le corps en éventail
flp : Flippase
GABA : l'acide gamma-aminobutyrique
gb : Genderblind
GCN2 : Protéine sérine/thréonine kinase General Control Nonderepressible 2
GDH : Glutamate Deshydrogenase
GFP : Protéine fluorescente verte

GR32a : Récepteur gustatif 32a
GR5a : Récepteur gustatif 5a
HAT : Transporteur d'acides aminés Hétérodimérique
iGluRs : Récepteurs au glutamate ionotropique
ilp2 : Gène codant la DILP2
InR : Récepteur aux DILPs
IP₃ : Inositol triphosphate
IPCs : Cellules productrices de DILPs
IVA : Indice de vigueur d'agressivité
JhI-21 : Juvénile hormone inductible 21
JNM : Jonction NeuroMusculaire
JPH203 : Inhibiteur spécifique de LAT1
KA : Récepteur au glutamate de type Kainate
KaiR1D : Sous-unité 1D de récepteur Kainate
KCy : Cellules de kenyon γ
KCs : Cellules de kenyon
KC α' / β' : Cellules de kenyon α' / β'
KC α / β : Cellules de kenyon α / β
KC α / β core : Cellules de kenyon centrale des lobes α / β
KDEL : Séquence peptidique de protéine membranaire du RE
KO : Knock out
LA : Lobe antennaire
IACA : Calice accessoire latéral des corps pédonculés
LAPTM4B : Protéine transmembranaire lysosomal 4 β
LAT : Large Amino acid Transporter
LAT1 : Large Amino acid Transporter 1
LcN : Lateral clock neuron
LH : Lateral Horn ou corne latérale
LN : Neurones latéraux
LO : Lobe optique
_{LO}**PN** : Neurones de projection de la lobula
LRR : Leucine-rich repeat
LTD : Dépression à long terme
LTM : Mémoire à long terme
LTP : Potentialisation à long terme
MBONs : Mushroom Body Output Neurons
mCD8::GFP : GFP membranaire
Merge : Superposition
Mg₂₊ : ions magnésium
mGluR : Récepteur au glutamate métabotropique
MIP : Neurones POMC like de drosophile
MND : Minidiscs
mTORC1 : Complexe 1 Target Of Rapamycin de mammifère
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NGS : Sérum de vœu foetal
nls : Signal de localisation nucléaire
NMDA : N-Méthyle-D-Aspartate
NMDAR : Récepteur au NMDA
NMDAR1 : Sous-unité 1 des récepteurs NMDAR
NMDAR2 : Sous-unité 2 des récepteurs NMDAR
NO : Nodules appariés
NOS : oxide nitrique synthase

NPF : Neuropeptide F
NPY : Neuropeptide Y
ns : non significatif
OAMB : Récepteur à l'octopamine de type OAMB
Oct β 2R : récepteur à l'octopamine de type β 2R
OR65a : Récepteur olfactif 65a
OR67d : Récepteur olfactif 67d
ORNs : Neurones sensoriels olfactifs
PAMs : neurones dopaminergiques du protocerebral Anterior Medial
PB : le pont protocérébral
pb : paire de base
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PI : Pars intercerebralis
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
_{PLP}**PN** : Neurones de projection du protocerebrum latéral postérieur
PN : Neurones de projection
POMC : Neurones synthétisant la pro opiomélanocortine
PPL1 : Neurones dopaminergiques du protocebrum lateral 1
PPL2ab : Neurones dopaminergiques du protocebrum lateral 2
PSD : Densité postsynaptique
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RE : Réticulum endoplasmique
RFP : Protéine florescente rouge
RGlus : Récepteurs au glutamate
ROI : Région d'intérêt
RT : Rétro transcription
Rut : Adenylate cyclase Rutabaga
SEM : Erreur standard
SEZ : Sous œsophagienne zone
SLC : Transporter Solute Carrier
SLC3A : Famille 3 de transporteurs SLC
SLC7A : Famille 7 de transporteurs SLC
SNC : Système Nerveux Central
sNPF : short Neuropeptide F
STM : Mémoire à court terme
TOR : Protéine sérine / thréonine kinase Target of Rapamycin
UAS : Upstream Activation Sequence
UTR : Region transcrite non traduite
vACA : Calice accessoire ventral des corps pédonculés
VAcHT : Vesicular acetylcholine transporter
VDRC : Vienne Drosophila Resource Center
w¹¹¹⁸ : *white¹¹¹⁸*
xCT : Cystine / glutamate échangeur (antiporteur)
ZT : Zeitgeber Time
 α - : anti-
 α/β ; α'/β' ; γ : Les différents lobes des corps pédonculés
 ΔF : delta de fluorescence

Index des figures

Fig. I1 : Structure et nom des vingt acides aminés standards.	20
Fig. I2 . Schéma représentant les différentes classes de transporteurs transmembranaires.	23
Fig. I3 : Les différents membres SLCs impliqués dans le transport d'AAs.	24
Fig. I4 : Représentation schématique d'un transporteur d'acides aminés hétérodimérique (HAT).	26
Fig. I5 : Schéma des voies de signalisation intracellulaires impliquant la protéine TOR.	31
Fig. I6 : Représentation schématique des principales structures du cerveau de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
Fig. I7 : Développement des Corps Pédonculés et les différentes $KC\alpha/\beta$	36
Fig. I8 : Schéma simplifié de l'architecture des CPs.	38
Fig. I9 : Schéma simplifié de la modulation des CPs par les neurones dopaminergiques.	40
Fig. I10 : Représentation schématique de la complexité des connexions entre KCs/DANs/MBONs.	41
Fig. I11 : Principales étapes du comportement d'agressivité sexe spécifique.....	45
Fig. M1 : Cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
Fig. M2 : Schéma du processus d'ARN interférence.	55
Fig. M3 : Schéma d'expression Gal4/UAS.	56
Fig. M4 : Schéma d'expression grâce à l'intersection d'expression génétique.....	57
Fig. M5 : Schéma représentant les différentes étapes d'une manipulation d'imagerie calcique fonctionnelle <i>ex vivo</i>	69
Fig. M6 : Représentation schématique de la génération des individus utilisés pour les tests de comportement.	71
Fig. M7 : Photos du dispositif d'arènes utilisé pour le comportement d'agressivité.	73
Fig. M8 : Schéma explicatif de la détermination de l'indice « # voisins » dans le test de « social spacing ».	76
Fig. R1 : Schéma du locus <i>mnd</i> avec ses 3 transcrits et son unique protéine.....	79

Fig. R2 : <i>mnd-RA</i> et <i>mnd-RC</i> sont exprimés dans les têtes et les corps des drosophiles.	81
Fig. R3 : Le niveau d'expression relatif de <i>mnd</i> est similaire entre les sexes, dans un fond génétique <i>w¹¹¹⁸</i> et <i>Canton S</i>	82
Fig. R4 : MND est présent dans les neurones et les cellules gliales du cerveau adulte.	83
Fig. R5 : Profil d'expression des différentes séquences régulatrices de <i>mnd</i>	84
Fig. R6 : Profil d'expression de <i>mnd²⁴⁻¹</i> dans l'intestin.	85
Fig. R7 : Profil d'expression de <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i>	87
Fig. R8 : Profil d'expression de <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> dans le corps ellipsoïde et les IPCs...	88
Fig. R9 : Profil d'expression de <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i>	89
Fig. R10 : Cellules exprimant communément <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> et <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i>	89
Fig. R11 : Profil d'expression des différents drivers Gal4 spécifiques des lobes des CPs.	92
Fig. R12 : Intersection d'expression génétique entre <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et les différents drivers spécifiques des CPs.	94
Fig. R13 : Profil d'expression de <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> dans les KC α / β	96
Fig. R14 : MND semble être localisée à la membrane du réticulum endoplasmique des KCs.	98
Fig. R15 : Activation des CPs par le glutamate (L-Glu).	100
Fig. R16 : Activation des CPs par les L-AAAs.	101
Fig. R17 : MND est nécessaire à l'activation des KC α / β en réponse à certains L-AAAs.	102
Fig. R18 : La Leucine active les KC α / β par une voie TOR dépendante.	104
Fig. R19 : L'environnement d'élevage n'impacte pas le comportement d'agressivité.	106
Fig. R20 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs n'impacte pas le comportement d'agressivité (1).	108
Fig. R21 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs n'impacte pas le comportement d'agressivité (2).	108

Fig. R22 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs n'impacte pas le comportement de parade sexuelle.	109
Fig. R23 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs potentialisé par <i>Dicer2</i> n'impacte pas significativement le comportement d'agressivité.	110
Fig. R24 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs n'intervient pas dans la modulation sociale du comportement d'agressivité.	111
Fig. R25 : L'inhibition de <i>mnd</i> dans les CPs ne semble pas modifier le placement des mâles dans un groupe.	112
Fig. R26 : Schéma simplifié de la détection des L-AAs par les CPs grâce à MND	113
Fig. II1 : Schéma de la synapse glutamatergique.	120
Fig. II2 : Six récepteurs au glutamate exprimés dans les corps pédonculés d'après Kondo <i>et al.</i> , 2020.	125
Fig. R27 : MND est nécessaire aux KCa/β pour répondre au L-Glu.	128
Fig. R28 : Les six récepteurs au glutamate identifiés par Kondo <i>et al.</i> dans les CPs semblent être coexprimés avec <i>mnd</i> dans des cellules du cerveau adulte.	129
Fig. R29 : <i>NmdaR1-Gal4</i> est exprimé dans les KCa/β (excepté les $KCa/\beta c$) et les KCa'/β'	130
Fig. R30 : <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> et <i>NmdaR1-LexA</i> sont communément exprimés dans les KCa/β (excepté les $KCa/\beta c$) et les KCa'/β'	131
Fig. R31 : <i>NmdaR1</i> et <i>ilp2</i> ou <i>Dh44</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	132
Fig. R32 : <i>NmdaR1-LexA</i> est exprimé dans les KCa'/β'	132
Fig. R33 : <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> et <i>NmdaR1-LexA</i> sont présents dans les KCa/β	133
Fig. R34 : <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> et <i>NmdaR1-LexA</i> sont communément exprimés dans quelques KCa/β	134
Fig. R35 : <i>NmdaR2-Gal4</i> est exprimé dans les KCa/β et KCa'/β'	135
Fig. R36 : <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et <i>NmdaR2-Gal4</i> sont communément exprimés dans les KCa/β (excepté les $KCa/\beta c$).	136
Fig. R37 : <i>NmdaR2</i> et <i>ilp2</i> ou <i>Dh44</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	136
Fig. R38 : <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et <i>NmdaR2-Gal4</i> sont communément exprimés dans des cellules de la PI.	136

Fig. R39 : <i>NmdaR2-LexA</i> ne semble pas s'exprimé dans les CPs.	137
Fig. R40 : <i>mnd²⁴⁻¹-Gal4</i> et <i>NmdaR2-LexA</i> sont communément exprimés dans des KC α / β	138
Fig. R41 : <i>KaiR1D-Gal4</i> est exprimé dans les KC α / β , les KC α' / β' et les KC γ	139
Fig. R42 : <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et <i>KaiR1D-Gal4</i> sont communément exprimés dans les KC α / β (excepté les KC α / β c) et les KC γ	140
Fig. R43 : <i>KaiR1D</i> et <i>ilp2</i> ou <i>Dh44</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	140
Fig. R44 : <i>mGluR-Gal4</i> est exprimé dans les KC α / β (excepté les KC α / β c), les KC α' / β' et les KC γ	141
Fig. R45 : <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et <i>mGluR-Gal4</i> sont communément exprimés dans les KC α / β (excepté les KC α / β c) et les KC γ	142
Fig. R46 : <i>mGluR</i> et <i>ilp2</i> ou <i>Dh44</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	142
Fig. R47 : <i>GluClα-Gal4</i> est exprimé dans les KC α / β	143
Fig. R48 : <i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i> et <i>GluClα-Gal4</i> sont communément exprimés dans les KC α / β (excepté les KC α / β c).	144
Fig. R49 : <i>GluClα</i> et <i>ilp2</i> ou <i>Dh44</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	144
Fig. R50 : Différents RGlus sont nécessaires aux CPs pour répondre au glutamate.	146
Fig. R51 : Le NMDA active les KC α / β	147
Fig. R52 : Les KC α / β sont directement activées par le NMDA via les NMDARs.	148
Fig. R53 : <i>mnd</i> et <i>homer</i> sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.	149
Fig. R54 : La dérégulation de différents RGlus et <i>homer</i> dans les KC α / β n'impacte pas leur capacité à répondre au NMDA.	150
Fig. R55 : MND est nécessaire aux KC α / β pour répondre au NMDA.	151
Fig. R56 : L'activation des KC α / β par la D-sérine est dépendante de MND.....	152
Fig. R57 : La dérégulation de <i>NmdaR1</i> dans les CPs n'impacterait pas le comportement d'agressivité.	153

Fig. R58 : <i>NmdaR1</i> dans les CPs n'interviendrait pas dans la modulation sociale du comportement d'agressivité.	154
Fig. R59 : Environnement social et dimorphisme sexuel sur la réponse des CPs au NMDA et l'expression de <i>NmdaR1</i>	155
Fig. R60 : La réponse des CPs au NMDA semble être modulée par la détection chronique de cVA.	156
Fig. R61 : La surexpression de <i>mnd</i> dans les $KC\alpha/\beta$ et γ phénocopie l'effet de l'isolement social sur la réponse des CPs au NMDA.	157
Fig. R62 : <i>mGluR</i> dans les CPs n'interviendrait pas dans le comportement d'agressivité (1).	158
Fig. R63 : <i>mGluR</i> dans les CPs n'interviendrait pas dans le comportement d'agressivité (2).	158
Fig. R64 : <i>mGluR</i> dans les CPs n'interviendrait pas dans la modulation sociale du comportement d'agressivité.	159
Fig. R65 : <i>mGluR</i> dans les $KC\alpha/\beta$ et γ semble inhiber l'agressivité physique.....	160
Fig. R66 : La dérégulation de <i>mGluR</i> dans les $KC\alpha/\beta$ et γ ne modifie pas le nombre de threats ni l'initiation du premier lunge.	161
Fig. R67 : La dérégulation de <i>mGluR</i> dans les $KC\alpha/\beta$ et γ ne semble pas modifier la parade sexuelle.	162
Fig. R68 : Schéma simplifié de l'activité des CPs en réponse au glutamate passant par une voie NMDARs et MND dépendante.	163
Fig. P1 : MND, NMDARs et <i>mGluR</i> , acteurs des corps pédonculés.	170
Fig. P2 : Implication hypothétique de MND dans l'apprentissage olfactif associatif au sein des KCs en régulant le clustering des NMDARs.	173

Index des tableaux

Tableau I : Lignées de drosophiles portant un transgène Gal4.	58
Tableau II : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation UAS.	59
Tableau III : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation UAS permettant l'expression d'un ARN interférent.....	60
Tableau IV : Lignées de drosophiles portant un transgène LexA.	61
Tableau V : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation LexAop.	61
Tableau VI : Liste des amorces utilisées en RT PCR.	64
Tableau VII : Liste des amorces utilisées en RT qPCR.	66
Tableau VIII : Listes des anticorps primaires utilisés en immunohistologie.....	67
Tableau IX : Listes des anticorps secondaires utilisés en immunohistologie.....	67

Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1

Introduction

Chaque organisme vivant évolue dans un écosystème en continuel changement, qui nécessite une adaptation permanente afin de survivre et de se reproduire. Les individus sont exposés à divers facteurs environnementaux abiotiques (température, hygrométrie, pression, luminosité...) et biotiques (phéromones, bruit / chant de parade sexuelle...) qui modulent différents aspects de leur vie (développement, croissance, reproduction...). Ces signaux externes à l'individu vont être détectés par des neurones sensoriels et impacter l'homéostasie générale de l'individu, en particulier les métabolismes nutritionnels et énergétiques. Ces changements internes vont être perçus et intégrés par le système nerveux central (SNC) qui va permettre l'élaboration de comportements complexes en adéquation avec les facteurs externes et internes détectés. Lors de la prise alimentaire, les nutriments vont traverser la barrière intestinale et se retrouver dans la circulation sanguine chez les mammifères ou dans l'hémolymphe de la cavité générale chez les invertébrés. Certains nutriments de l'alimentation peuvent être détectés par le SNC, jouant le rôle de molécules signal et modifiant ainsi son fonctionnement. Parmi ces molécules, les acides aminés (AAs) ont un rôle central, non seulement pour la synthèse protéique, mais également pour modifier directement le fonctionnement des neurones et permettre l'ajustement des comportements (Bjordal *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2018).

Objectif de la thèse

Au sein du laboratoire, un des axes de recherche de l'équipe est de mieux comprendre l'impact des odeurs (phéromones ou de nourriture) et de l'alimentation sur la régulation des comportements sociaux. C'est dans ce but que l'implication de transporteurs d'acides aminés est étudiée dans la régulation du fonctionnement du SNC en utilisant le modèle *Drosophila melanogaster*. Lors de mon arrivée en thèse, je me suis donc intéressée à l'adaptabilité des comportements et les mécanismes neuronaux associés. Ainsi, l'objectif principal de ma thèse a été de déterminer la fonction de MINIDISCS (MND), un transporteur d'AAs, au sein de neurones du SNC des drosophiles adultes.

1. Les acides aminés (AAs).

Pour tous les organismes vivants, de l'Homme à la drosophile, un apport adéquat en nutriments, et notamment en AAs, est crucial pour assurer de nombreuses fonctions dont la croissance post-embryonnaire (Manière *et al.*, 2020 ; Texada *et al.*, 2020), la survie (Grandison *et al.*, 2009 ; Tatar, 2011), la reproduction (Good et Tatar, 2001 ; Grandison *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2022), la production d'œufs (Min et Tatar, 2006 ; Piper *et al.*, 2017) l'apprentissage (Brünner *et al.*, 2020), le sommeil (Ki et Lim, 2019)...

A. Généralités concernant les acides aminés.

Les AAs sont des molécules organiques constituées d'un squelette carboné sur lequel viennent se fixer une fonction acide carboxylique (COOH) et une fonction amine (NH₂). Les AAs de structure H₂N-HCR-COOH, où le carbone α porte la fonction amine, sont appelés α -amines (Fig.I1). Ils sont pour la plupart protéinogènes, c'est-à-dire qu'ils sont utilisés pour la production de protéines. Tous les AAs, exceptée la glycine, sont des molécules chirales qui peuvent se présenter sous forme de deux énantiomères différents : Lévogyre (L) ou Dextrogyre (D). Les AAs protéinogènes sont quasiment tous de type L, même si des D-AAs peuvent être incorporés au sein de molécules comme le peptidoglycane de la paroi bactérienne (Heijenoort, 2001). Les L-AAs peuvent subir des modifications post-traductionnelles les transformant en forme D-AAs dans le réticulum endoplasmique, processus mis en évidence chez le gastéropode *Conus gladiatodes*, (Jimenez, 2017).

Certains AAs peuvent être synthétisés à partir de précurseurs de manière endogène au sein des cellules, en plus d'être apportés par l'alimentation. Certains de ces AAs sont dits fonctionnels (FAAs) car la quantité de production par les cellules peut être insuffisante pour satisfaire les besoins physiologiques de l'organisme à certains stades du développement (Wu, 2010). Il est donc nécessaire que les organismes subviennent à leurs besoins en FAAs par l'alimentation. Le L-Glutamate et la L-Glutamine semblent être des FAAs chez les mammifères (Wu, 2010). D'autres AAs ne peuvent pas être synthétisés par les organismes, ils doivent donc nécessairement être apportés par l'alimentation. Ces acides aminés sont qualifiés d'acides aminés essentiels (EAAs). Cette classification est dépendante de l'espèce considérée et du stade développemental étudié. Au sein de ces EAAs, trois sont qualifiés d'AA ramifiés (BCAAs) : la leucine, l'isoleucine et la valine. La figure I1

présente les vingt AAs standards protéinogènes ; les trois BCAAs et les dix EAAs chez la drosophile.

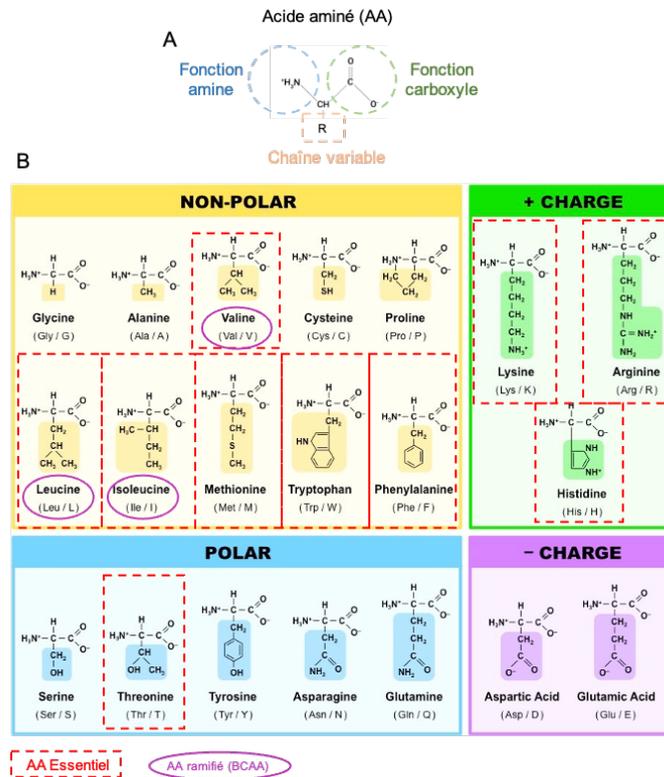


Fig. I1 : Structure et nom des vingt acides aminés standards.

A) La structure générale d'un acide aminé avec, entourée en bleu, la fonction amine, entourée en vert la fonction carboxyle et encadrée en beige la chaîne variable (notée R). B) Les vingt AAs sont classés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques : Les AAs chargés à droite : les chargés positivement en vert et les chargés négativement en violet. A gauche, les AAs non chargés : en jaune les apolaires et en bleu les AAs polaires. Les EAAs (acides aminés essentiels) chez les drosophiles sont encadrés en pointillés rouges et les BCAAs (acides aminés ramifiés) sont entourés en violet. Figure modifiée d'après Sushil Humagain site web science notes for all (onlinesciencenotes.com/author/sushil/)

B. Rôles des AAs sur la physiologie et le système nerveux

Les AAs protéinogènes sont des composants clés de tout organisme vivant. Ce sont les briques élémentaires constitutives des protéines, dont ils définissent la structure tridimensionnelle et les propriétés physico-chimiques. Par exemple, les motifs riches en L-Leucine (Leucine-rich repeats LRRs) ont un rôle dans les interactions physiques protéiques, permettant ainsi aux protéines de se dimériser (Kobe et Kajava, 2001). Les AAs peuvent également être une source d'énergie lors d'une restriction calorique. Au sein de la mitochondrie, l'oxydation de la chaîne carbonée (par transamination) du glutamate, permet d'utiliser cet AA comme substrat pour la production d'énergie sous forme d'ATP au sein du cycle de Krebs (Plaitakis *et al.*, 2017). De manière intéressante, les AAs jouent également un rôle prépondérant lors

du développement du système nerveux. La plupart des neuroblastes entrent et sortent du cycle cellulaire d'une manière nutriment dépendante chez la larve de drosophile (Shim *et al.*, 2013).

Les AAs peuvent servir de précurseurs d'hormones comme le tryptophane, précurseur de la mélatonine (hormone du sommeil) ou la tyrosine, précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline (Fernstrom *et al.*, 2007). De plus, les AAs peuvent également servir de précurseurs de neurotransmetteurs, comme le tryptophane, précurseur de la sérotonine ; la tyrosine, précurseur de la L-dopa et de la dopamine (Vömel *et al.*, 2008 ; Richard *et al.*, 2009). Ainsi que le glutamate qui peut être le précurseur du principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC : l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Fernstrom, 1994). Chez la drosophile, la tyrosine est le précurseur de l'octopamine, molécule apparentée à la noradrénaline des vertébrés (Lange, 2009). De plus, des AAs peuvent directement agir comme molécule signal et activer des processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la synthèse protéique, la transcription de gènes (Frappaolo et Giansanti, 2023). Le glutamate peut directement être utilisé comme neurotransmetteur au sein du SNC, que ce soit chez les mammifères ou la drosophile (Traynelis *et al.*, 2010). De plus, des D-AAAs peuvent jouer des rôles primordiaux dans certains processus physiologiques. Chez les vertébrés comme chez les invertébrés, la D-sérine et le D-Aspartate sont retrouvés dans divers tissus, et interviendraient dans le développement du système nerveux, le système endocrinien et la communication nerveuse (Li *et al.*, 2018). La D-sérine, gliotransmetteur synthétisé par les cellules gliales, est également un co-activateur des récepteurs au glutamate de type NMDA (Shleper *et al.*, 2005 ; Wolosker et Balu, 2020 ; Park *et al.*, 2022) et serait impliqué dans le comportement de recherche d'eau chez la drosophile (Park *et al.*, 2022).

Ces acides aminés synthétisés par l'organisme ou provenant de l'alimentation doivent pouvoir passer les membranes biologiques des cellules. De par leur nature lipophile, ce passage ne peut pas se faire de manière passive. Ainsi, le transport des AAs est facilité par des protéines transmembranaires spécialisées, appelés transporteurs d'acides aminés. La dérégulation de ce transport peut conduire au développement de troubles métaboliques et énergétiques au sein des cellules (Zhang *et al.*, 2019). Cela affecte le bon fonctionnement du SNC, conduisant au développement de maladies (Ayka et Sehirli, 2020). Par exemple les maladies du spectre autistique

(Tarlungeanu *et al.*, 2016) qui semblent trouver leur origine dans une dérégulation de l'homéostasie des BCAAs au sein du SNC. De plus, le développement de glioblastomes (tumeurs cérébrales) demande un soutien métabolique et énergétique intense pour se diviser, faisant en général appel à des transporteurs d'acides aminés pour assurer leurs besoins (Cappoli *et al.*, 2022). Ces études mettent en lumière l'importance de transporteurs d'AAs de type Solute Carrier (SLC) dans l'émergence de dysfonctionnements du SNC et semble être des cibles de choix pour développer de nouvelles thérapies (Ayka et Sehirli, 2020).

L'étude des propriétés et des fonctions de ces transporteurs d'acides aminés, ainsi que leur spécificité dans l'influx et l'efflux d'AAs au sein du SNC, et particulièrement au niveau des synapses, permettront de mieux comprendre le fonctionnement physiologique et pathologique du SNC.

2. Les transporteurs transmembranaires d'acides aminés

Les transporteurs sont des protéines transmembranaires présentes au niveau de toutes membranes biologiques. Au niveau de la membrane plasmique (bicouche lipidique) ces protéines permettent le contrôle des échanges de molécules lipophobes, comme les AAs, entre le compartiment intracellulaire et extracellulaire, afin d'assurer les besoins de la cellule. Les transporteurs sont également essentiels pour l'échange de molécules entre les différents organites tels que la mitochondrie, les lysosomes, le réticulum endoplasmique (RE), vésicules... assurant ainsi les cycles énergétique et métabolique de la mitochondrie par exemple (Pizzagalli *et al.*, 2021) (Fig.I2).

Différentes classes de transporteurs sont identifiées suivant leur mode de fonctionnement. Les transporteurs ATP-dépendants que sont les transporteurs ABC et les pompes ATPases. Le transport indépendant de l'ATP médié par les canaux ioniques et les aquaporines. Et enfin, les transporteurs ATP-indépendants qui ne sont pas des canaux : les transporteurs Solute Carrier (SLC) (Hediger *et al.*, 2013) (Fig.I2).

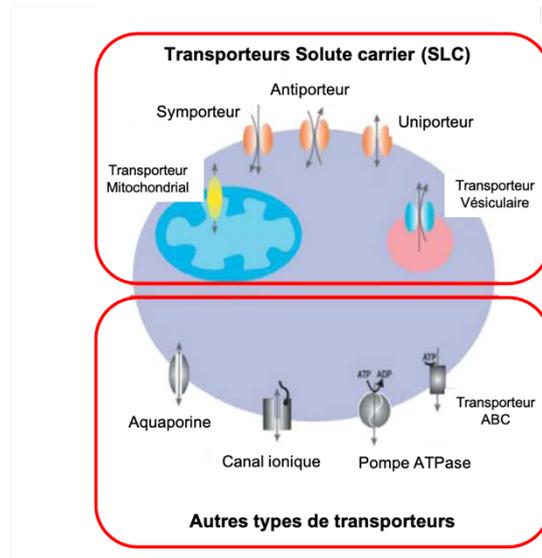


Fig. I2. Schéma représentant les différentes classes de transporteurs transmembranaires.

L'encadré du haut regroupe les transporteurs transmembranaires de la famille des Solute carrier (SLC). Ces transporteurs peuvent être localisés à la membrane mitochondriale (transporteur mitochondriale) au niveau des membranes vésiculaire (transporteur vésiculaire), ainsi qu'au niveau des lysosomes ou du réticulum endoplasmique (non montrés ici). Principalement, les SLCs se localisent à la membrane plasmique. Ils peuvent être symporteurs, antiporteurs ou uniporteurs. L'encadré du bas illustre les différentes familles de transporteurs transmembranaires ne faisant pas partie des SLCs. Notamment, les canaux ioniques et aquaporines (ATP indépendants), ainsi que les pompes ATPase et les transporteurs ABC, hydrolysant l'ATP pour fonctionner. Figure modifiée d'après Hediger *et al.*, 2013.

A. Les Solute carriers (SLCs)

Les SLCs regroupent un grand nombre de transporteurs qui ont des affinités de transport pour différentes classes de molécules, dont les acides aminés. Ils peuvent être uniporteurs (influx ou efflux d'un AA), symporteurs (influx d'un AA couplé à l'influx d'un ion) ou antiporteurs (influx d'un AA couplé à l'efflux d'un autre AA), permettant ainsi le transport passif d'AAs (Fig. I3) (Hediger *et al.*, 2013). Le transport d'AAs actif (transport contre le gradient de concentration) nécessite le couplage avec un autre substrat dans le sens de son gradient de concentration, tel que Na^+ ou H^+ . Les pompes ATPases ont un rôle central dans la création de ces gradients. Elles utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin de transporter de manière active des ions contre leur gradient électrochimique. Ce gradient ainsi créé est utilisé par les SLCs afin de permettre le transport de molécules pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Bergeron *et al.*, 2008). Ainsi, les SLCs se localisant à la membrane plasmique sont les principales « portes » d'entrée des AAs dans l'espace intracellulaire. Environ 60% des SLCs dont la localisation est connue se trouvent au niveau de la membrane plasmique (Pazzagalli *et al.*, 2021).

Les SLC comptent à ce jour 65 familles regroupant 458 protéines chez l'Homme (Pizzagalli *et al.*, 2021), et 381 protéines chez la drosophile (Ceder et Fredriksson, 2022).

Les SLCs forment une large famille de transporteurs très conservée des bilatériens à l'humain (Höglund *et al.*, 2011 ; Ceder et Fredriksson 2022). Tous les SLCs transportent des substrats en utilisant le gradient électrochimique existant (générés par des pompes ATPases) ou par diffusion passive. Ces substrats peuvent être de différentes natures : AAs, oses, peptides, neurotransmetteurs, médicaments... (Hediger *et al.*, 2013). Les SLCs sont définis par leur similarité de fonctionnement plutôt que par leur degré d'homologie. Cependant, les séquences protéiques doivent tout de même partager au moins 20% d'homologie pour être classées dans les différentes familles de SLCs (Hediger *et al.*, 2013). Les SLCs sont localisés au niveau de différentes membranes biologiques les impliquant dans un grand nombre de processus cellulaires (Pizzagali *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2019). Au sein du laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à la sous-famille SLC7A, impliquée dans le transport d'AAs. Ses membres peuvent être uniporteurs ou antiporteurs (Gauthier-Coles *et al.*, 2021) (Fig.I3).

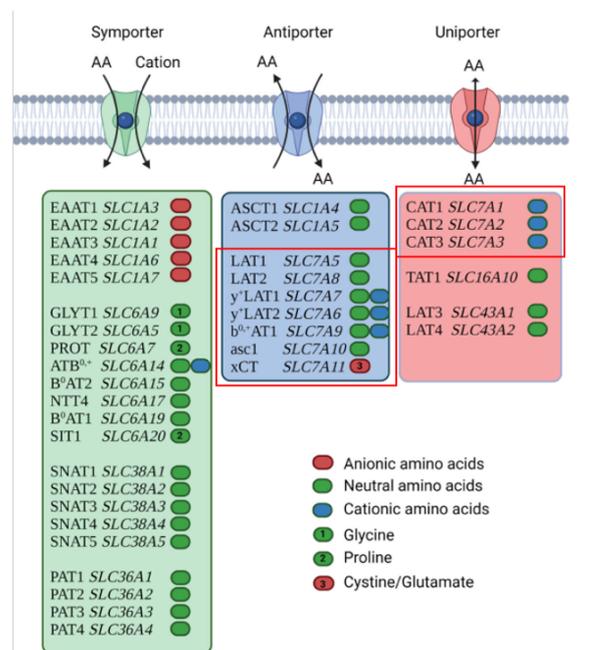


Fig. I3 : Les différents membres SLCs impliqués dans le transport d'AAs.

Les transporteurs symbolisés en vert sont des symporteurs, ils permettent l'influx d'AAs couplé à un cation. Le nom des membres des SLCs appartenant à cette catégorie est listé dans l'encadré vert (suivant l'exemple : EAAT1 (nom de la protéine mammifère) ; SLC1A3 (nom du gène)). Les transporteurs en bleu sont des antiporteurs ou échangeurs, ils permettent l'influx d'un AA couplé à l'efflux d'un autre AA. Le nom des membres des SLCs appartenant à cette catégorie est listé dans l'encadré bleu. Les transporteurs symbolisés en rose sont des uniporteurs, ils permettent l'efflux ou l'influx d'un AA suivant son gradient. Le nom des membres des SLCs appartenant à cette catégorie est listé dans l'encadré rose. Les transporteurs appartenant à la sous-famille des SLC7A sont encadrés en rouge, ils peuvent être antiporteurs ou uniporteurs. Modifiée d'après Gauthier-Coles *et al.*, 2021.

Le sous-groupe des SLC7A comprend onze protéines pouvant être subdivisées en deux catégories principales suivant la nature de l'AA transporté. Les Cationic

Amino acid Transporters (CATs), de SLC7A1 à SLC7A4 (Closs *et al.*, 2006 ; Ceder et Fredriksson, 2022) et les Large neutral Amino acid Transporters (LATs), de SLC7A5 à SLC7A8 ou SLC7A9 suivant les sources (Fotiadis *et al.*, 2013 ; Gauthier-Coles *et al.*, 2021 ; Ceder et Fredriksson, 2022). Cependant, certains LATs (SLC7A6 et SLC7A7) pourraient transporter les deux types d'AAs (Fig.I3). Les cas particuliers de SLC7A10 et SLC7A11 ne semblent pas faire partie des CATs ni des LATs.

a. Les transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs).

Les CATs sont généralement fonctionnels en monomères et sont des uniporteurs. Ils sont spécialisés dans le transport d'acides aminés cationiques (chargés positivement), comme l'arginine ou la lysine, de manière Na⁺ indépendante (Closs *et al.*, 2006 ; Verrey *et al.*, 2004). L'arginine fait partie des EAAs chez les invertébrés et des FAAs chez certains vertébrés (Wu, 2010), son transport au sein des cellules est donc essentiel pour certaines réactions enzymatiques comme la synthèse de l'urée, de la proline ou de la glutamine. De plus, l'arginine est le substrat de l'oxide nitrique synthase permettant la production d'oxide nitrique (Closs *et al.*, 2006). Chez la drosophile, des CATs tel que SLIMFAST dans des neurones dopaminergiques larvaires (Bjordal *et al.*, 2014) ou CG13248 (potentiel orthologue de SLC7A4) dans des neurones du cerveau adulte exprimant la Diuretic Hormone 44 (DH44+) (Yang *et al.*, 2018) sont impliqués dans la régulation des comportements alimentaires.

b. Les transporteurs d'acides aminés neutres (LATs).

Les LATs acquièrent leur capacité de transport en se dimérisant avec une glycoprotéine de la famille des SLC3A (Mastroberardino *et al.*, 1998). De ce fait, ils sont appelés transporteurs d'acides aminés hétérodimériques (HATs) (Wagner *et al.*, 2001 ; Verrey *et al.*, 2004 ; Fotiadis *et al.*, 2013). Ils sont constitués d'une chaîne dite lourde (SLC3A) et d'une chaîne dite légère (SLC7A) (Fig.I4). Ils sont impliqués dans le transport d'AAs neutres (Alanine, Sérine, Leucine...). Les SLC7A sont présents au niveau de la membrane de certains organites tel le lysosome (Milkereit *et al.*, 2015) ou le RE (Manière *et al.*, 2016), mais surtout au niveau de la membrane plasmique de nombreux types cellulaires (Pizzagalli *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2019). Les SLC7A jouent donc des rôles cruciaux dans le fonctionnement de la cellule.

c. *Les transporteurs hétérodimériques (HATs) de type SLC3A/SLC7A.*

Chez les mammifères, la famille des SLC3A est composée de deux membres : SLC3A1 (rBat, D2, NBAT) et SLC3A2 (4F2hc, CD98). Les SLC3A se dimérisent avec les protéines de la famille des SLC7A qui compte 11 membres (SLC7A1-11). Les SLC3A (chaînes lourdes) permettent l'ancrage du complexe à la membrane et sa stabilisation (Pfeiffer *et al.*, 1998 ; Nakamura *et al.*, 1999) alors que les SLC7A (chaîne légère) sont les sous-unités permettant la spécificité de transport des AAs (Fig.I4). Le dimère spécifique SLC3A2/SLC7A5, aussi appelé LAT1, est impliqué dans l'influx d'AAs neutres, comme la leucine, l'isoleucine..., mais également dans le transport de L-DOPA et des hormones thyroïdiennes (Fotiadis *et al.*, 2013). Il est important de noter que SLC3A2 peut jouer un rôle dans la modulation des propriétés des intégrines contrôlant ainsi la migration, la prolifération et la communication cellulaire (Feral *et al.*, 2005 ; Prager *et al.*, 2007). CD98 est également impliqué dans l'apport de glucose et de nucléotides au sein de cellules tumorales, soutenant ainsi leur division cellulaire et le maintien de l'homéostasie redox (Cano-Crespo *et al.*, 2019).

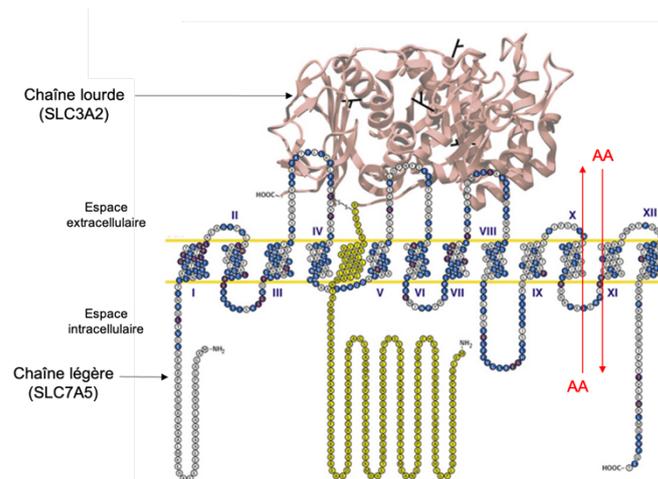


Fig. I4 : Représentation schématique d'un transporteur d'acides aminés hétérodimérique (HAT).

Un HAT est composé d'une chaîne lourde de type SLC3A (ici SLC3A2), permettant l'ancrage à la membrane et d'une chaîne légère de type SLC7A (ici SLC7A5), impliquée dans la spécificité du transport d'acides aminés. Les deux chaînes peptidiques sont associées par un point disulfure au niveau de la deuxième boucle extracellulaire de la chaîne légère. La chaîne lourde est glycosylée et présente un domaine transmembranaire. La chaîne légère présente 12 domaines transmembranaires numérotés de I à XII et n'est pas glycosylée. AA : Acides Aminés. Modifié d'après Fotiadis *et al.*, 2013.

Chez la drosophile, un unique membre des SLC3A a été caractérisé, appelé CD98hc, potentiel orthologue de SLC3A2 (Reynolds *et al.*, 2009). Cinq gènes codant des protéines présentant de forte similarité de séquence peptidique (environ 50%) avec des membres de la famille des SLC7A ont été identifiés : *minidiscs*, *genderblind*,

sobremesa, *JhI-21* et *CG1607* (Martin *et al.*, 2000 ; Featherstone 2011 ; Augustin *et al.*, 2007 ; Galagovsky *et al.*, 2018 ; Dubrovsky *et al.*, 2002). Cependant, l'identification d'orthologue par homologie de séquence peptidique ne permet de déterminer avec certitude les orthologues fonctionnels et donc les caractéristiques de transport. Il est nécessaire de démontrer expérimentalement les caractéristiques de chaque protéine afin de démontrer leur appartenance à un système de transport spécifique.

c1. Chaîne lourde des HATs chez Drosophila.

CD98hc a été mis en évidence par Reynolds *et al.*, 2009 dans les cellules S2 en culture. Cette chaîne lourde associée à une chaîne légère (JHI-21 ou MND) est impliquée dans l'import de leucine de manière Na^{2+} et voltage indépendant, le classant dans les LATs et l'impliquant dans le transport du système L (Reynolds *et al.*, 2009 ; Fotiadis *et al.*, 2013). CD98hc est présente au niveau de la membrane plasmique des cellules de l'embryon (Tan *et al.*, 2009) et des cellules S2 en culture (Galagovsky *et al.*, 2018). Ainsi, CD98hc est nécessaire à un grand nombre de transports d'AAs en association avec les différentes chaînes légères (Reynolds *et al.*, 2009 ; Galagovsky *et al.*, 2018). CD98hc est au centre de nombreux mécanismes cellulaires, qui sont dérégulés au sein des cellules neuronales cancéreuses (Rebelo et Homen, 2023).

c2. Chaînes légères de HATs chez Drosophila.

CG1607 est un potentiel orthologue de SLC7A8, un LAT (Ceder et Fredriksson, 2022). Ce gène apparaît dans un screen génétique (ChIP) dont l'expression est activée par le 20-hydroxyecdysone (Mazina *et al.*, 2021). CG1607 est localisée dans des neurones exprimant le Diuretic Hormone 44 (DH44+), mais ne semble pas intervenir dans la régulation de la consommation de nourriture, comportement contrôlé par ces neurones DH44+ (Yang *et al.*, 2018).

Genderblind est un potentiel orthologue de SLC7A11 (xCT) (Augustin *et al.*, 2007) ou SLC7A5 (LAT) (Ceder et Fredriksson, 2022). Il permet le transport de cystine extracellulaire, 2 résidus cystéines liées entre eux par un pont disulfure, en échange de glutamate intracellulaire (Augustin *et al.*, 2007). Ainsi, il permet le maintien du potentiel redox dans la cellule et l'élimination des espèces réactives à l'oxygène par l'import de cystine (Conrad et Sato, 2012). Il est également impliqué dans le relargage

non vésiculaire de glutamate dans l'espace extracellulaire (Augustin *et al.*, 2007). Ce transporteur est retrouvé au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM) et dans certaines cellules gliales du cerveau larvaire (Augustin *et al.*, 2007). Chez la larve, *gb* est impliqué dans la régulation de la concentration de glutamate dans l'hémolymphe régulant ainsi le regroupement des récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluRs) au niveau des membranes post-synaptiques des JNMs. Une mutation de *gb* semble diminuer d'environ 38% la concentration de glutamate de l'hémolymphe, 57% la taurine et 35% la L-Glutamine (Piyankarage *et al.*, 2010). Cette diminution de la concentration de glutamate hémolympatique induite par une mutation de *gb* entraîne un fort enrichissement de iGluR à la membrane (Augustin *et al.*, 2007). Chez l'adulte, Genderblind est présent au sein de cellules gliales entourant des centres olfactifs et gustatifs (les lobes antennaires, le calice des corps pédonculés et de la zone sous-œsophagienne) (Grosjean *et al.*, 2008). La dérégulation de *gb* entraîne une diminution de glutamate au sein de la fente synaptique glutamatergique. *gb* est impliquée dans la régulation du comportement de parade sexuelle. Sa dérégulation au sein des cellules gliales conduit à une parade homosexuelle inter-mâles, expliquée en partie par une défaillance du système olfactif et gustatif, rendant les mâles incapables de discriminer les phéromones répulsives d'autres mâles (Grosjean *et al.*, 2008).

Ainsi, ces études expérimentales suggèrent fortement que Genderblind appartient à la classe des transporteurs HATs antiporteur cystine/glutamate plutôt qu'aux HATs de type LATs, comme le laisse supposer la comparaison de sa séquence avec les SLCs mammifères (Ceder et Fredriksson, 2022).

Sobremesa est un potentiel orthologue de SLC7A9, un LAT (Ceder et Fredriksson, 2022). Cette chaîne légère de HAT est colocalisée avec CD98hc à la membrane des cellules S2 en culture (Galagovsky *et al.*, 2018) suggérant la formation d'un hétérodimère (HAT). Chez la larve, Sobremesa est localisée au niveau des cellules gliales et est impliquée dans le contrôle du développement larvaire (Galagovsky *et al.*, 2018). Lorsque ce gène est dérégulé, il conduit à une augmentation de la taille du corps de la larve et à un retard de développement du cerveau de manière indépendante de la voie insuline (Galagovsky *et al.*, 2018).

Juvénile hormone Inducible 21 (JhI-21) est un potentiel orthologue de SLC7A5, un LAT (Ceder et Fredriksson, 2022). L'expression de *JhI-21* est régulée par l'hormone juvénile (Dubrovsky *et al.*, 2002). Reynolds et collaborateurs (2009) ont mis en évidence

que JHI-21 forme un hétérodimère fonctionnel avec CD98hc pour l'import de leucine extracellulaire au sein des cellules S2. JHI-21 est présente au niveau de la JNM larvaire, où il régule le regroupement des iGluRs à la membrane post synaptique de la JNM. Sa dérégulation conduit à des défauts de locomotion (Ziegler *et al.*, 2016), soulignant ainsi l'implication d'un transporteur d'AA de type SLC7A dans le bon fonctionnement synaptique. Chez la larve, JHI-21 est également présente dans les cellules productrices d'insuline (IPCs), neurones du SNC (Ziegler *et al.*, 2018). Dans ces cellules, JHI-21 est impliquée dans le transport de leucine extracellulaire permettant la sécrétion de *Drosophila* Insulin-Like Peptides (DILPs) de manière dépendante de la Glutamate Deshydrogenase (GDH), contrôlant ainsi le métabolisme larvaire (Manière *et al.*, 2016 ; Ziegler *et al.*, 2018). À l'âge adulte, JHI-21 est retrouvée au sein de neurones dopaminergiques et intervient dans le contrôle du sommeil (Aboudhief *et al.*, 2018). Tout comme dans les cellules gliales péri et subpérineurale composant de la barrière hématoencéphalique (BHE) où JHI-21 contribue à un apport adéquat en leucine dans l'hémolymphe, stabilisant l'activité neuronale GABAergique et favorisant ainsi le sommeil (Li *et al.*, 2023). Ainsi, ce SLC7A présent au niveau de la BHE régule l'afflux de leucine (un EAA), permettant le fonctionnement du système GABAergique.

Minidiscs est un potentiel orthologue de SLC7A5, un LAT (Ceder et Fredriksson, 2022). Des études sur les disques imaginaux ont permis de mettre en évidence le rôle de *minidiscs* (*mnd*) dans le développement de ces structures (Shearn *et al.*, 1971). Les disques imaginaux mutants pour *mnd* sont plus petits que les témoins et ne montrent pas la capacité à se différencier en structure d'imago (Shearn *et al.*, 1971 ; Shearn et Garen, 1974). Les défauts développementaux des disques imaginaux observés sont liés à l'absence d'un facteur diffusible dans l'hémolymphe des larves mutantes *minidiscs* (Shearn *et al.*, 1971 ; Shearn et Garen, 1974, Martin *et al.*, 2000). Les transcrits de *mnd* semblent être dynamiquement exprimés tout au long du développement : fortement chez l'embryon et le stade imago et plus faiblement au 1^{er} stade larvaire et quasi absent des stades larvaires avancés et du stade pupal (Martin *et al.*, 2000). *minidiscs* code une protéine à 12 domaines transmembranaires (Martin *et al.*, 2000). De plus, MND a été décrit par Reynolds et collaborateurs (2009) comme transporteur de leucine en s'associant avec CD98hc. MND a été localisée dans le cerveau larvaire et adulte (Manière *et al.*, 2016, Simonnet, 2015 ; Aboudhief *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2023 ; Park *et al.*, 2022) comme l'avait suggéré la présence d'ARNm de *mnd* dans ces tissus par Martin et collaborateurs (2000). Chez la larve, MND est présente

dans les IPCs et intervient dans la sécrétion de DILPs, en réponse à la leucine (Manière *et al.*, 2016 ; Ziegler *et al.*, 2018). Chez l'adulte, MND au sein des neurones dopaminergiques (Aboudhiaf *et al.*, 2018) et des cellules gliales constituant la BHE (Li *et al.*, 2023) est impliquée dans le contrôle du sommeil.

Ainsi, JHI-21 et MND semblent bien appartenir à la famille des transporteurs LATs, impliqués dans le transport notamment de leucine. De plus, il apparaît que ces protéines sont impliquées dans le bon fonctionnement du SNC. C'est pourquoi nous nous intéressons particulièrement à MND

Une fois transportés à l'intérieur des cellules grâce, entre autres, aux transporteurs de type SLC, les AAs vont pouvoir être utilisés et activer des voies intracellulaires spécifiques. Parmi celles-ci, les voies impliquant la protéine Target of Rapamycin (TOR), une sérine/thréonine kinase, sont les plus étudiées de par sa présence chez tous les eucaryotes, y compris les plantes (Menand *et al.*, 2002). Ces voies TOR dépendantes ont des rôles centraux dans le contrôle du développement des organismes en réponses aux facteurs de croissances et aux AAs (Kapahi *et al.*, 2004 ; Manière *et al.*, 2020).

B. Activation de voies intracellulaires par les AAs

Chez les mammifères, comme chez la drosophile, un gène codant TOR a été identifié. La protéine TOR est la sous-unité catalytique de deux complexes nommés mTORC1 et mTORC2, où mTORC1 est particulièrement bien connu (Liu et Sabatini, 2020). mTORC1 peut être activé par les facteurs de croissances, comme l'insuline, qui va induire la translocation de mTORC1 à la surface des lysosomes afin qu'il puisse être activé par Rheb résidant à la membrane lysosomale (Milkereit *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2021). mTORC1 peut également être activé par des FAAs, comme l'arginine ou la glutamine, et des EAAs tel que la leucine ou la méthionine, par des cascades signalétiques qui leur son propre (Fig.I5). Il en résulte une activation de la synthèse protéique et lipidique, la traduction de gènes impliqués dans ces machineries de synthèse (via la protéine S6K), une stimulation du métabolisme énergétique des mitochondries et l'inhibition de l'autophagie. Tous ces processus contribuent à la croissance de la cellule et son bon fonctionnement dans les conditions nutritionnelles optimales. Lors d'une carence en leucine, le complexe mTORC1 est inhibé et ne peut pas être transloqué aux lysosomes, activant ainsi l'autophagie et la transcription de

gènes de réponses aux stress via la protéine 4E-BP (Fig.I5). Ainsi, TOR est une protéine centrale dans les voies de détection des AAs et permet d'adapter le métabolisme cellulaire en fonction des ressources en AAs présentes (Liu *et al.*, 2021 ; Frappaolo et Giansanti, 2023) (Fig.I5).

Chez la drosophile, la protéine TOR semble avoir de nombreuses similarités par rapport à celle des mammifères (Kapahi *et al.*, 2004). TOR peut être activée par les acides aminés, notamment la leucine, qui va se lier à la protéine Sestrine afin de permettre l'activation de TOR (Gu *et al.*, 2022 ; Lee *et al.*, 2010), stimulant ainsi la croissance et la synthèse protéique. De plus, TOR peut être activé par la voie « insuline » médiée par les DILPs et leur unique récepteur InR (Colombani *et al.*, 2003 ; Manière *et al.*, 2020).

De manière parallèle, un manque d'AAs au sein de la cellule, dû à un défaut de transport d'AAs ou une restriction alimentaire, va diminuer le nombre d'AAs pouvant se charger sur un ARN de transfert. L'augmentation du nombre d'ARN de transfert non chargés va être détectée par une autre protéine kinase très conservée : la GCN2 (General Control Nonderepressible 2) (Srivastava *et al.*, 2022 ; Bjordal *et al.*, 2014). Une fois activée GCN2 va permettre de lever l'inhibition de Rheb, activant ainsi TOR, que ce soit chez les mammifères ou la drosophile.

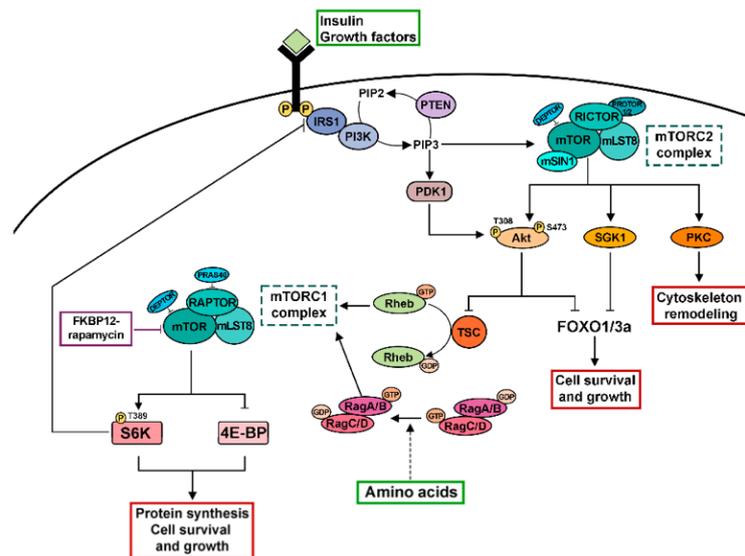


Fig. I5 : Schéma des voies de signalisation intracellulaires impliquant la protéine TOR.

La protéine TOR (Target of Rapamycin) peut être activée par différentes voies de signalisation, notamment par les AAs et l'insuline. Associé à différentes protéines régulatrices, TOR intervient dans de nombreux processus tel que la synthèse de protéines, la survie et la croissance cellulaire, le remodelage du cytosquelette d'actine ou l'autophagie. Modifiée d'après Frappaolo et Giansanti, 2023.

C. Les maladies associées à LAT1 (SLC3A2/SLC7A5)

Le développement tumoral demande un soutien métabolique et énergétique intense pour se diviser, faisant appel à des transporteurs d'acides aminés pour assurer leurs besoins. LAT1, orthologue putatif de MND, fait partie du système L : transport d'acides aminés neutres de manière Na⁺ indépendante. Dans les cellules tumorales, l'afflux de leucine par LAT1 est un puissant activateur de la signalisation mTORC1 et promeut la croissance tumorale (Kobayashi *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2020). Le dimère spécifique SLC3A2/SLC7A5 (aussi appelé CD98/LAT1) présente un grand intérêt en recherche sur les cancers. A l'heure actuelle, un inhibiteur spécifique de LAT1 : JPH203 est en cours d'essais cliniques pour le traitement de cancers (Okano *et al.*, 2018 ; Otani *et al.*, 2023). La dérégulation de LAT1 au niveau de la BHE serait corrélée à la gravité et la progression de la maladie de Parkinson (Ohtsuki *et al.*, 2010). De plus, les maladies du spectre autistique trouveraient leur origine dans une dérégulation de la balance des AA ramifiés (BCAA), comme la leucine, dans le SNC et pourrait être liée à une dérégulation de LAT1 au niveau de la BHE. En effet, Tarlungeanu et collaborateurs (2016) démontrent que la dérégulation de LAT1 dans les cellules endothéliales de la BHE induit une diminution des interactions sociales et un déficit de l'activité moteur, qui sont des symptômes de l'autisme. Ce phénotype peut être partiellement rétabli par une injection de BCAA dans le cerveau. De plus, il semble que SLC7A5 ait un impact sur le fonctionnement du canal potassique voltage dépendant Kv1.2 lié à certaines épilepsies (Baronas *et al.*, 2018).

Ainsi, les LATs, de par leur fonction de transport d'AAs au sein de la cellule apparaissent comme des molécules clés dans la physiologie des cellules incluant les neurones et les cellules gliales présents dans le SNC. Leur dérégulation est associée à des maladies neuronales encore mal comprises. De ce point de vue, l'étude des fonctions de ces transporteurs d'acides aminés semble importante pour la meilleure compréhension du fonctionnement du SNC et pourrait aider à l'amélioration des traitements associés aux maladies du SNC. Le développement d'outils génétique sophistiqués et la conservation des principaux mécanismes neuronaux chez la drosophile, fait de cet organisme un modèle adéquat pour répondre à ces questions.

3. Le système nerveux central (SNC) chez *Drosophila*.

Le système nerveux central (SNC) est composé d'un grand nombre de neurones et de cellules gliales. De nombreuses similitudes fonctionnelles peuvent être observées entre le cerveau humain qui compte environ 86 à 100 milliards de neurones formant plus de $1,5 \times 10^{14}$ connexions synaptiques et celui de la drosophile qui compte approximativement 100 000 neurones et 5×10^7 synapses (O'Kane *et al.*, 2011 ; Scheffer *et al.*, 2020). Ces similarités portent sur la transmission synaptique, les mécanismes de formation de vésicules, de sécrétion ou de recapture de neurotransmetteurs qui mettent en jeu des voies de signalisation et des protéines très conservées (pompes ioniques, canaux voltage ou ligand-dépendants ou indépendants, transporteurs, récepteurs) (O'Kane *et al.*, 2011 ; Parker *et al.*, 2011). Il existe cependant des disparités importantes entre ces deux SNC. Le ratio neurones / cellules gliales n'est pas le même, chez les mammifères les cellules gliales peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules du cerveau, chez les insectes, ce ratio est d'environ 10% (Edwards et Meinertzhagen, 2010). Chez les mammifères, les neurones sont majoritairement multi ou bipolaires et organisés en couches synaptiques successives. Chez la drosophile, les neurones sont unipolaires et organisés en neuropiles (O'Kane *et al.*, 2011 ; Parker *et al.*, 2011). Contrairement aux mammifères, chez la drosophile le neurone présynaptique active généralement les neurites de plusieurs autres neurones, où une densité postsynaptique (PSD) marque l'emplacement des récepteurs (Scheffer *et al.*, 2020). De plus, le renforcement des connexions se forment en augmentant le nombre de synapses en parallèle et non en formant des synapses plus grandes, comme chez les vertébrés (Scheffer *et al.*, 2020). Les principaux neurotransmetteurs sont communs, comme le glutamate, le GABA, la dopamine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'histamine. Cependant, chez les mammifères, le glutamate est le principal neurotransmetteur activateur du SNC, alors que chez la drosophile c'est plutôt le rôle de l'acétylcholine (O'Kane *et al.*, 2011).

Ainsi, les similitudes fonctionnelles entre le cerveau des mammifères et de la drosophile, ainsi que le séquençage complet de son génome (Adams *et al.*, 2000), la diversité des outils génétiques actuellement disponible et l'homologie d'environ 77% des gènes humains associés à des maladies (Kim *et al.*, 2020) font de ce modèle biologique un parfait sujet d'étude pour décrypter les fonctions des transporteurs d'acides aminés de types SLC au sein du SNC. Ces études permettront une meilleure

compréhension du fonctionnement de SNC physiologique et pathologique (Jeibmann et Paulus, 2009 ; Kim *et al.*, 2020).

Chez l'Homme, l'encéphale est formé de plusieurs structures, comme l'hippocampe, qui est un centre intégratif de multiples signaux, siège de fonctions cognitives telles que la mémoire et l'apprentissage (Anand et Dhikav, 2012). Chez la drosophile, l'organisation en neuropiles des neurones permet également de distinguer des structures bien particulières. Par exemple, le complexe central, structure recevant les signaux visuels, est impliqué dans le contrôle de la navigation (Neuser *et al.*, 2008). Ce complexe est composé de plusieurs éléments distincts : le corps ellipsoïde (EB), le corps en éventail (FB) ; le pont protocérébral (PB) et les nodules appariés (NO) (Fig.I6). Chaque élément semble avoir des fonctions bien précises dans le contrôle de la navigation, comme la mémorisation des éléments spatiaux par les neurones de l'EB (Neuser *et al.*, 2008). Chez la drosophile, la structure souvent associée à l'hippocampe sont les Corps Pédonculés (CPs), impliqués dans la mémoire, l'intégration des informations olfactifs et semblent être central dans l'émergence d'un grand nombre de comportements (Fig.I6). Cette structure nous intéresse particulièrement dans notre étude car les neurones la composant expriment la chaîne légère de HATs MND (Simonnet, 2015).

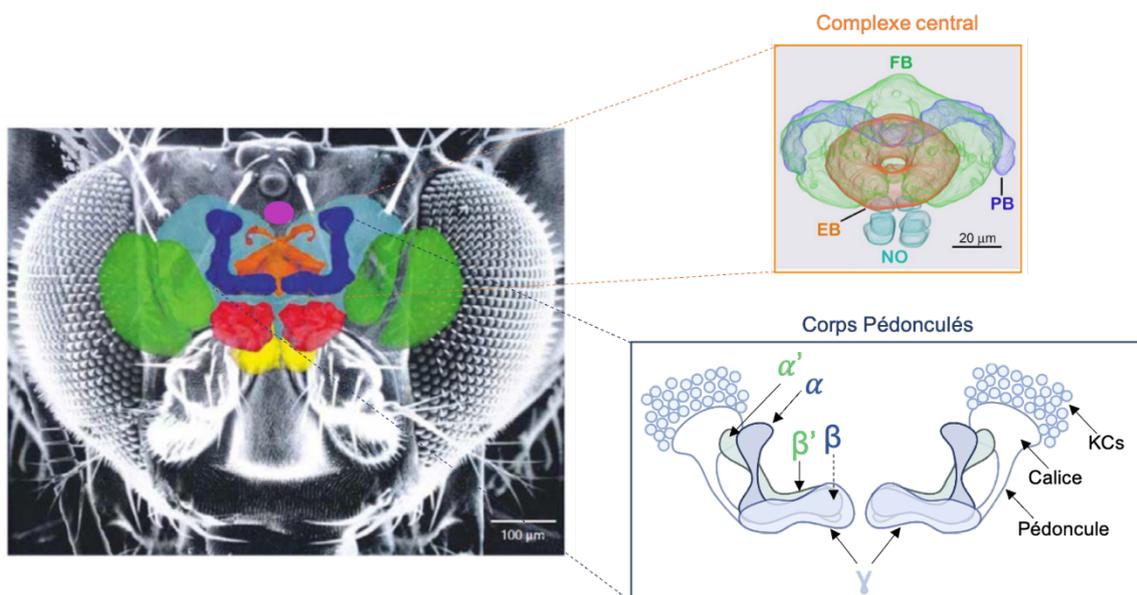


Fig. I6 : Représentation schématique des principales structures du cerveau de *Drosophila melanogaster*.

Les principaux centres nerveux de la drosophile sont représentés en fausses couleurs au sein de la capsule céphalique. Vert : les lobes optiques ; rouge : les lobes antennaires ; orange : le complexe central ; jaune : zone sous-césophagienne ; violet : cellules de la Pars Intercerebralis ; turquoise : autres structures nerveuses non détaillées. (Heisenberg, 2003). Un focus est fait sur le complexe central (encadré orange). Cette structure est composée du corps en éventail en vert (FB) ; du corps ellipsoïde en orange (EB) ; du pont protocérébral en bleu foncé (PB) et des nodules appariés (NO) (Wolff *et al.*, 2015). Un focus est fait sur les Corps Pédonculés dans l'encadré bleu. Les

corps cellulaires des neurones qui les constituent appelés cellules de Kenyons (KCs) sont représentés par des cercles. Les axones des KCs forment le pédoncule et vont projeter dans différentes directions du cerveau formant ainsi des lobes. Trois lobes médians : β , β' et γ ; et deux lobes verticaux α et α' .

A. Les Corps Pédonculés (CPs)

Les Corps Pédonculés (CPs) sont des structures neuronales bilatérales retrouvées dans le cerveau des arthropodes et certains annélides (Tomer *et al.*, 2010). Les CPs ont été décrits pour la première fois chez l'abeille par Félix Dujardin en 1850. Chez la drosophile, les CPs sont présents chez la larve et l'adulte et sont formés de neurones pouvant être classés en trois types suivant les neuropiles qu'ils forment : les neurones γ , les neurones α'/β' et les neurones α/β (Fig.I6). Ces neurones proviennent de la division et différenciation de 4 neuroblastes par hémisphères (Ito et Hotta, 1992). Les neurones γ , au nombre de 701 (Li *et al.*, 2020) sont les premiers à se différencier à l'état larvaire (du 1^{er} au début du 3^{ème} stade larvaire). Ils projettent leur axone en deux directions : horizontale et verticale (Fig.I7). Durant la pupaison, les axones verticaux régressent et ne subsistent que les axones horizontaux à l'âge adulte (Jefferis *et al.*, 2002). Ce sont les seuls neurones des CPs à ne pas avoir d'axone bidirectionnel. Les neurones α'/β' , au nombre de 337 (Li *et al.*, 2020) vont se différencier au 3^{ème} stade larvaire et également projeter leur axone en deux directions, formant les lobes α'/β' . Les neurones α/β , au nombre de 889 (Li *et al.*, 2020) débutent leur différenciation 24 heures après le début de la pupaison et cette différenciation va continuer jusqu'à l'âge adulte. Ils forment alors les lobes α/β . Les derniers neurones des CPs à se former sont localisés au centre de ces lobes α/β , c'est la raison pour laquelle ils sont appelés α/β core (α/β c) (Fig.I7). Leur différenciation tardive suggère une fonction particulière chez l'adulte et non au stade larvaire.

Ainsi, les corps pédonculés forment 5 neuropiles différents : trois lobes médians β , β' et γ , et deux lobes verticaux α et α' (Aso *et al.*, 2014) (Fig.I6). Au sein de ces lobes, les axones des neurones s'organisent en couches : les lobes α/β en couches p, c et s ; les lobes α'/β' en couches a,m et p ; et les lobes γ en couches main et d (Fig.I8).

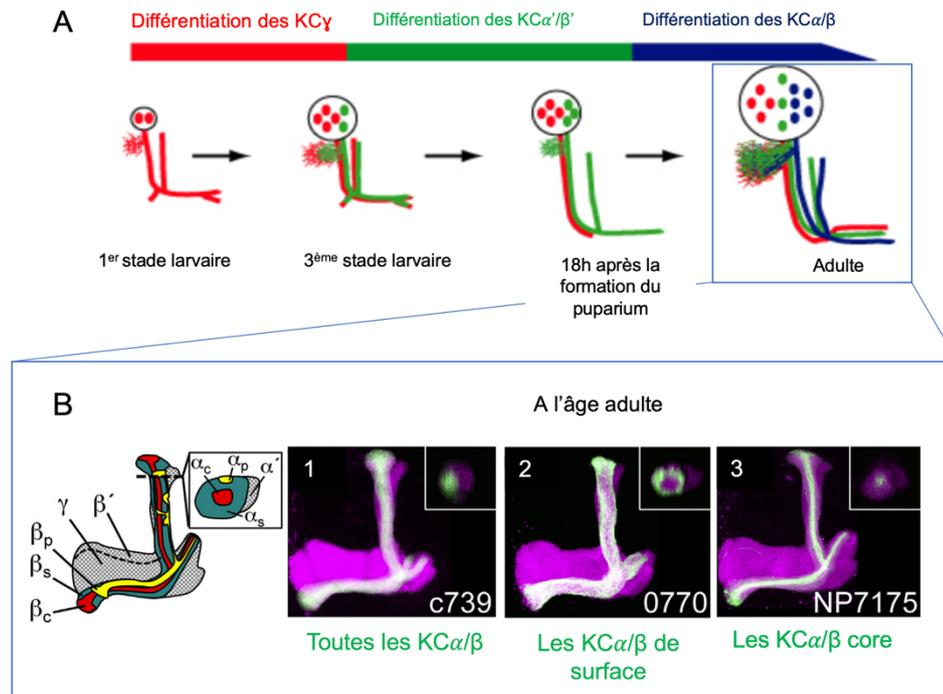


Fig.17 : Développement des Corps Pédonculés et les différents KC α/β .

A) Au 1^{er} stade larvaire commence la différenciation des 701 KC γ représentées en rouge. Puis au 3^{ème} stade larvaire commence la différenciation des 337 KC α'/β' représentées en vert, et finalement la différenciation des 889 KC α/β commençant à l'état pupal et finissant à l'âge adulte par les neurones appelés KC α/β core. B) Schéma des différents neurones composants les lobes $\alpha\beta$ et représentation d'une section de pédoncule. En rouge les α core, en bleu les α de surface, en jaune les α_p et en gris les α' . L'image 1 montre en vert toutes les KC α/β (ciblées par le driver c739) et en magenta les autres lobes. L'image 2 montre en vert les KC de surface (ciblées par le driver 0770) et l'image 3 montre en vert les KC α/β core (ciblées par le driver NP7175). Modifiée d'après Jefferis et al., 2002 et Perisse et al., 2013.

Chez l'adulte *Drosophila melanogaster*, les CPs sont formés d'environ 2 000 à 2 500 neurones par hémisphère (Technau et Heisenberg, 1982, Aso et al., 2014), appelés les Cellules de Kenyon (KCs) en référence à F.C. Kenyon qui les a définies pour la première fois dans son papier « The brain of the bee » en 1896. Les corps cellulaires des KCs sont localisés en région dorso-postérieure du cerveau. Dans chaque hémisphère, les KCs présentent de manière symétrique une arborescence dendritique formant un calice principal et 3 calices accessoires (dorsal, ventral et latéral) (Aso et al., 2014 ; Yagi et al., 2016 ; Li et al., 2020) (Fig.18). Le calice principal est une région anatomique et fonctionnelle des CPs indispensable à l'intégration des signaux olfactifs car les insectes anosmiques en sont totalement dépourvus comme les cicadidae (Strausfeld et al., 1998). Les calices principaux sont les zones de connexions synaptiques entre les dendrites des KCs et les axones des neurones de projections (PNs) provenant des lobes antennaires. Ces régions des CPs reçoivent donc les inputs olfactifs (Fig.18). Les calices accessoires ventraux et dorsaux, quant à eux, reçoivent les informations visuelles, provenant respectivement des lobes optiques (LO) via le neurone $LOPN$ et du protocerebrum latéral postérieur via le neurone $PLPN$ (Li et al., 2020). Enfin, les calices latéraux reçoivent des

inputs d'informations thermiques (Frank *et al.*, 2015) et sont acheminés aux $KC\alpha'/\beta'a$ (Li *et al.*, 2020).

Ainsi, les CPs reçoivent au niveau des calices quatre types de signaux sensoriels différents : les stimuli olfactifs, gustatifs, visuels et thermiques. En analysant l'anatomie des neurones des CPs et leurs connexions, il est possible d'identifier les KCs impliquées dans l'intégration de chacun des quatre types d'inputs sensoriels (Aso *et al.*, 2014). Les KCs recevant des inputs olfactifs étendent leurs dendrites uniquement dans le calice principal, sont de 5 types : les $KC\alpha/\beta_c$, $KC\alpha/\beta_s$, $KC\alpha'/\beta'p$, $KC\alpha'/\beta'm$ et les $KC\gamma_{main}$ (Ellis *et al.*, 2023 ; Aso *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2020). Les KCs recevant les inputs visuels sont les $KC\alpha/\beta_p$ et les $KC\gamma_d$. Ces KCs concentrent leur arborescence dendritique dans le calice accessoire dorsal ou ventral (Aso *et al.*, 2014 ; Vogt *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2020). En enfin, les $KC\alpha'/\beta'a$ recevant les inputs thermiques, hydriques et gustatifs concentrent leur arborescence dendritique dans le calice accessoire latéral (Li *et al.*, 2020 ; Marin *et al.*, 2020 ; Masek et Scott, 2010) (Fig.I8).

La classification des différentes KCs évolue en permanence grâce aux techniques d'imagerie et de reconstruction 3D des connectomes. Cela a permis de mettre en lumière de nouvelles sous-populations de KCs. Li et collaborateurs (2020) décrivent une sous-population de $KC\gamma$, composée de 8 neurones dont l'arbre dendritique est localisé dans le calice accessoire latéral, recevant les inputs des neurones thermo et hygro-sensibles et possiblement des inputs gustatifs (Kirkhart et Scott, 2015).

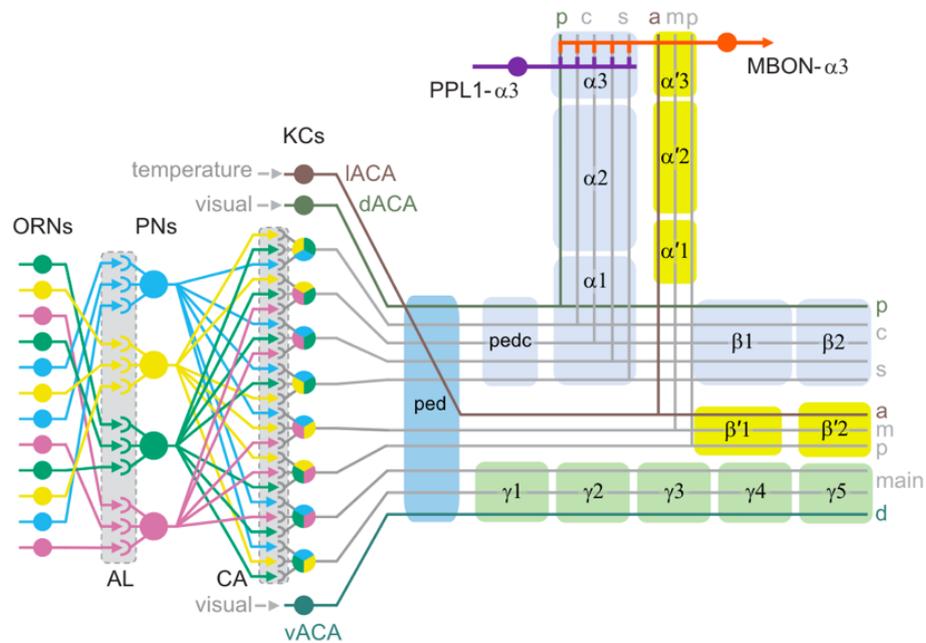


Fig. I8 : Schéma simplifié de l'architecture des CPs

Les différents compartiments des lobes α/β sont représentés en bleu clair ($\alpha 1$; $\alpha 2$; $\alpha 3$; $\beta 1$ et $\beta 2$). Les différentes couches d'axones des KCs sont représentés par les traits traversant les lobes (couches p , c et s). Les différents compartiments des lobes α'/β' sont représentés en jaune ($\alpha' 1$; $\alpha' 2$; $\alpha' 3$; $\beta' 1$ et $\beta' 2$) et les couches d'axones des KCs par des traits (couche a , m et p). Les lobes γ sont représentés en vert ($\gamma 1$; $\gamma 2$; $\gamma 3$; $\gamma 4$ et $\gamma 5$), avec leurs différentes couches d'axones ($main$ et d). Les neurones sensoriels olfactifs (ORNs) reçoivent des signaux sensoriels. Ils vont projeter leur axone au niveau des lobes antennaires (AL) où ils font des connexions synaptiques avec les neurones de projections (PNs). Ce sont ces neurones qui vont transmettre leur message nerveux aux cellules de Kenyon (KCs) au niveau du calice principal (CA). Les KCs recevant ces signaux olfactifs projettent leur axone dans les différents lobes des CP, représentés par les traits gris (couches axones c , s , m , p et $main$). Les signaux visuels arrivent au niveau des calices accessoires ventral et dorsal (dACA et vACA), et les KCs les recevant vont former la couche p des lobes α/β ou la couche d des lobes γ , respectivement (traits verts). Les signaux thermiques vont arriver au niveau du calice accessoire latéral (IACA) et les KCs les recevant vont former la couche a des lobes α'/β' (trait marron). Le neurone PPL1- $\alpha 3$ (violet) représente un exemple de neurone dopaminergique régulant l'activité des CPs. Le neurone MBON- $\alpha 3$ (orange) représente un exemple de neurone de sortie des CPs. D'après Li et al., 2020.

Cette analyse montre que le découpage des KCs en fonction des 3 lobes qu'elles forment n'est pas représentatif des types d'informations sensorielles reçues. Cette définition permet surtout d'identifier anatomiquement des sous-populations de KCs. Ainsi, les 3 types de lobes (α/β , α'/β' et γ) peuvent recevoir des inputs olfactifs et gustatifs. Les inputs visuels par une sous-population de $KC\alpha/\beta$ et γ ; alors que les inputs thermiques passent par une sous-population de $KC\alpha'/\beta'$. Le cas des signaux gustatifs implique des neurones $KC\gamma$ dont l'arborescence dendritique se localise dans le calice principal et le calice accessoire latérale.

Enfin, les lobes des CPs sont entourés de cellules gliales étendant leurs prolongements au sein des lobes, mais ne semblent pas compartimenter physiquement les lobes (Kremer et al., 2017 ; Takemura et al., 2017), même si des compartiments

fonctionnels apparaissent à la lumière du connectome des CPs. Récemment, il a été montré que les cellules gliales engainantes entourant les CPs jouent un rôle dans le contrôle de l'apprentissage associatif (Miyashita *et al.*, 2023).

Une fois que les KCs ont reçu les informations sensorielles au niveau de leurs dendrites, les messages nerveux sont générés le long de leur axone formant le pédoncule et les lobes. Les messages nerveux vont être modulés par des neurones afférents aux CPs, principalement dopaminergiques (DANs) avant d'être transmis aux neurones de sorties des CPs appelées Mushroom body output neurones (MBONs).

a. Modulation des CPs par les neurones dopaminergiques (DANs)

Les DANs sont classiquement divisés en trois groupes de neurones, les PPL1 (Protocebrum Lateral 1 neurones dopaminergiques), les PAMs (Protocerebral Anterior Medial neurones dopaminergiques) et les PPL2ab (Protocebrum Lateral 2ab neurones dopaminergiques) (Fig.I9).

Les PPL1 innervent principalement les lobes verticaux des CPs (α et α') et sont activés par des stimuli avec une valence négative telle qu'un choc électrique (Masek *et al.*, 2015 ; Aso *et al.*, 2010). Les PPL1 sont donc associés aux apprentissages associatifs par stimuli aversif (punition) et sont classés en six types cellulaires (Li *et al.*, 2020).

Les PAMs innervent principalement les lobes médians (β , β' et γ) et sont activés par des stimuli avec une valence positive telle que les molécules sucrées. Les PAMs sont alors associés aux apprentissages par la récompense (Felsenberg *et al.*, 2017 ; Jacob et Waddell, 2020). Quinze types de PAMs différents ont été définis (Li *et al.*, 2020).

Les PPL2ab innervent le calice des CPs et semblent impliqués dans le stockage et la restitution de la mémoire à long terme (LTM) (Boto *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2020).

Ainsi, la dopamine (dérivée de la tyrosine) régule donc l'apprentissage associatifs par les signaux appétitifs ou aversifs en modulant l'activité des KCs. De plus, les DANs sont sensibles aux signaux internes comme la faim et la soif (Siju *et al.*, 2020). Ils permettent alors de reconfigurer les connexions KC>MBON pour diriger les informations olfactives vers les MBONs appropriés (Lin, 2023).

Les CPs sont également innervés par des neurones GABAergiques, octopaminergiques et sérotoninergiques qui modulent leur activité (Lin, 2023 ; Li *et al.* 2020).

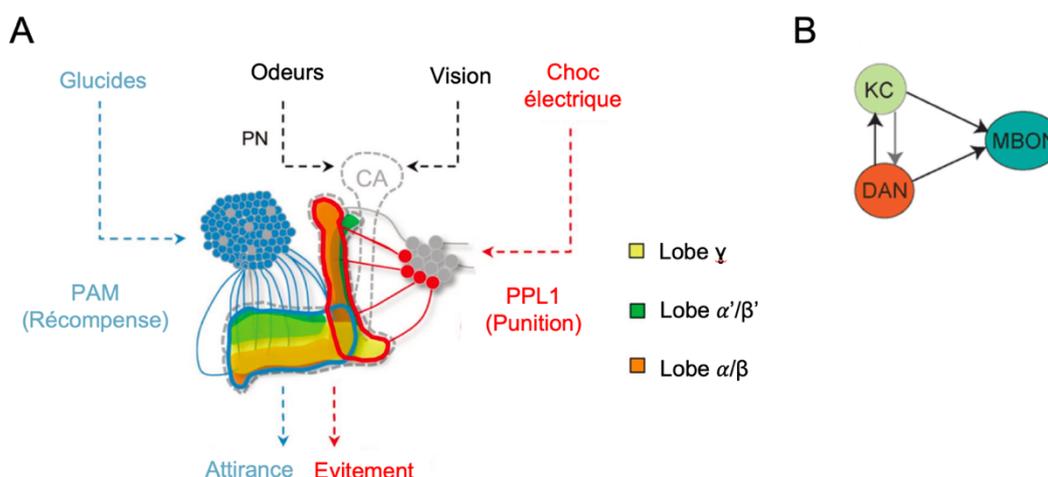


Fig. I9 : Schéma simplifié de la modulation des CPs par les neurones dopaminergiques.

A) Les neurones dopaminergiques PAM sont activés par des molécules à valence attractive comme le sucre et vont innover les lobes médians (lobes β , β' et γ) afin d'induire un comportement d'attraction. Les neurones dopaminergiques PPL1 sont activés par des signaux aversifs comme des chocs électriques. Ces neurones innervent les lobes verticaux des CPs (lobes α et α') et vont permettre aux individus d'avoir un comportement d'évitement. B) Diagramme simplifié des interconnexions entre les KCs, les neurones dopaminergiques (DAN) et les neurones de sortie des CPs (MBON). Modifié d'après Vogt *et al.*, 2014 et Siju *et al.*, 2020

Après modulation par les neurones afférents, les KCs transmettent leur message intégré aux MBONS par une voie cholinergique, faisant intervenir *ChAT* et *VACHT* (Barnstedt *et al.*, 2016). Cette transmission cholinergique est indispensable à la formation de la mémoire aversive. En effet, l'inhibition des récepteurs nicotiques impacte les comportements impliquant l'identification des odeurs (Séjourné *et al.*, 2011 ; Barnstedt *et al.*, 2016). L'activité synaptique des lobes avec les MBONS est modulée par les DANs innervant ces lobes (Li *et al.*, 2020 ; Aso *et al.*, 2014). Les MBONS vont ensuite transmettre les informations intégrées des CPs vers d'autres structures du cerveau.

b. Les neurones de sortie des CPs : les MBONS

Les MBONS forment des connexions synaptiques au niveau des lobes des CPs et vont connecter cette structure aux autres régions du cerveau. Vingt sous-populations de MBONS ont premièrement été décrites, puis quatorze MBONS atypiques supplémentaires ont été identifiés (Li *et al.*, 2020). Ces neurones peuvent être classés selon le neurotransmetteur qu'ils sécrètent : glutamate, GABA ou acétylcholine, qui correspondent également à des groupes anatomiques et fonctionnels (Li *et al.*, 2020) (Fig.I10). Les dendrites des MBONS glutamatergiques s'arborescent principalement au sein des lobes horizontaux (β , β' et γ), qui sont

également innervés par des PAMs représentant la récompense. Ce sont notamment, le MBON- $\beta 2\beta'2\alpha$ (Shen *et al.*, 2023 ; Crocker *et al.*, 2016), le MBON- $\gamma 5\beta'2\alpha$ (Crocker *et al.*, 2016 ; Barnstedt *et al.*, 2016), le MBON $\beta'2mp$ (Barnstedt *et al.*, 2016), le MBON $\beta'2mp$ bilatéral (Li *et al.*, 2020), et le MBON $\gamma 4>\gamma 1\gamma 2$ (Aso *et al.*, 2014). De plus, 3 MBONs atypiques sont prédits pour être glutamatergiques : le MBON $\gamma 1\gamma 2\gamma 3$, le MBON $\gamma 1\gamma 2$ et le MBON $\gamma 1$ (Li *et al.*, 2020) mais également les 2 MBON $\alpha 1$ (Li *et al.*, 2020) et le MBON- $\beta 1>\alpha$ glutamatergiques innervent les lobes α (Aso *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2023). Un MBON glutamatergique (MBON- $\beta'2mp$) a été identifié dans la formation et le retour de la LTM, mais pas dans la mémoire résistante à l'anesthésie (ARM) (Wu *et al.*, 2017). Ainsi, le glutamate semble être un neurotransmetteur important pour la formation de la mémoire au sein des CPs. De plus, la LTM nécessite une synthèse de protéines de manière séquentielle (Wu *et al.*, 2017), ce qui suggère un apport adéquat en AAs dans les neurones pour synthétiser ces protéines.

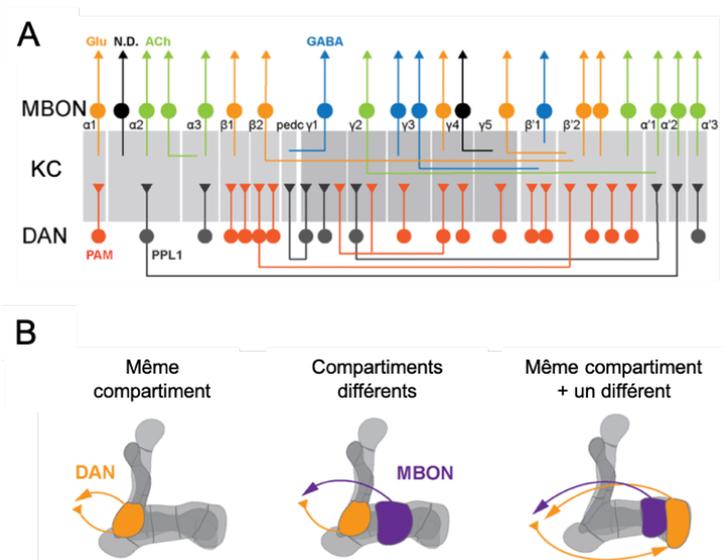


Fig. I10 : Représentation schématique des connexions entre DANs /KCs/MBONs.

A) Les cellules de Kenyon sont représentées par les carrés gris. Les neurones dopaminergiques modulant leur activité sont représentés en dessus, les PAMs en rouge et les PPL1 en noir. Au-dessus des KCs sont représentés les neurones de sortie des CPs appelés MBONs. Les MBONs orange sont glutamatergiques, les MBONs verts sont cholinergiques, les MBONs bleus sont GABAergiques et les MBONs noirs ne sont pas encore identifiés. B) Représentation des différentes boucles de rétroaction des DANs (orange) et MBONs (violet) sur les CPs (gris). Ces boucles peuvent être au sein d'un même compartiment des CPs, dans des compartiments différents ou les deux en même temps. Modifiée d'après Li *et al.*, 2020.

c. Implication des différentes KCs dans les processus cognitifs

De par leur implication centrale dans l'intégration des signaux sensoriels externes, les CPs sont nécessaires à l'élaboration de la mémoire et l'apprentissage, ainsi que dans les comportements faisant appel à ces fonctions cognitives.

Les lobes α/β sont impliqués dans la formation de la LTM, la consolidation ainsi que le rappel de la mémoire (Krashes et Waddell, 2008). Ils sont également impliqués dans la formation de la mémoire résistante à l'anesthésie (ARM), contrairement aux lobes γ qui ne semblent pas impliqués dans cette forme de mémoire (Isabel *et al.*, 2004). Mais ces lobes γ semblent essentiels à la plasticité synaptique soutenant l'apprentissage olfactif aversif (Hancock *et al.*, 2022). Quant aux lobes α'/β' , ils sont impliqués dans la consolidation de la mémoire appétitive (Krashes *et al.*, 2007). Les lobes α'/β' des CPs des jeunes adultes (1 jour) ont une forte activité neuronale spontanée comparée à des CPs d'individus matures (7-8 jours). Cette modification de l'activité spontanée apparaît primordiale pour permettre à l'individu d'améliorer son apprentissage (Leinwand et Scott, 2021). Il apparaît donc évident que l'activité des CPs est dépendante de l'âge.

Toutes ces études se sont intéressées à la fonction des CPs dans la formation de la mémoire et dans l'apprentissage associatifs. Cependant, cette structure joue également un rôle dans d'autres processus. Les lobes α/β sont impliqués dans le contrôle de la longévité via Rab27 et la voie TOR, particulièrement les $KC\alpha/\beta$ p (Lien *et al.*, 2020). La locomotion est également régulée par les CPs (Serway *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2018). Le réflexe de géotaxie négative implique les lobes α'/β' (Riemensperger *et al.*, 2013). Les neurones des lobes γ permettent l'intégration des signaux visuels et olfactifs qui promeuvent le rapprochement social (Sun *et al.*, 2020). De plus, les CPs sont impliqués dans la régulation de comportement sociaux comme l'agressivité (Baier *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2009 ; Zwarts *et al.*, 2011 ; Zwarts *et al.*, 2015 ; Chouhan *et al.*, 2017).

Ainsi, les CPs semblent importants pour diriger les comportements sociaux et MND est retrouvée au niveau de cette structure (Simonnet, 2015). C'est pourquoi je me suis principalement intéressée aux comportements sociaux régulés par les CPs.

4. Les comportements sociaux

Un comportement social est défini par les interactions entre individus d'une même espèce qui vont moduler les comportements ultérieurs. Les insectes sociaux, comme les abeilles ou les fourmis, montrent un large éventail de comportements sociaux comme la recherche de nourriture, la formation de hiérarchie au sein d'un groupe, la coopération, les comportements de parade sexuelle ou d'agressivité. Ces interactions nécessitent la détection de signaux chimiques, visuels ou acoustiques pour communiquer entre eux. De plus, la mémorisation et l'apprentissage des expériences passées contribuent au développement, au contrôle et à l'adaptation de ces interactions. Ainsi, les facteurs environnementaux ou internes modulant l'apprentissage contrôlent en partie les comportements sociaux. De par l'implication de tous ces paramètres, la compréhension neurologique globale de la mise en place de comportements sociaux et des pathologie associées est complexe et encore mal comprise. L'utilisation d'un modèle « simple » comme la drosophile permet de décortiquer le fonctionnement neurologique de l'émergence et la régulation de ce type de comportement. En effet, comme les insectes eusociaux, les drosophiles montrent des comportements sociaux d'agrégation en groupe (Sun *et al.*, 2020), des stratégies de recherche de nourriture modulées par la vie en groupe, des comportements de parade sexuelle ou d'agressivité (Chen *et al.*, 2002 ; Trannoy *et al.*, 2015 ; Hoopfer, 2016).

A. L'attraction sociale

Les animaux sociaux en tendance à être attirés par leurs congénères afin de former un groupe et peuvent ainsi former, dans certains cas, des hiérarchie complexes et des comportements de coopération. Par exemple, les souris ont une tendance innée à aller vers un congénère lorsqu'elles sont placées ensemble dans un espace clos. Cette motivation à aller vers l'autre est déficitaire chez les individus atteints de troubles mentaux comme l'autisme ou la dépression. Cette attraction sociale se retrouve chez les drosophiles et est médiée par la détection d'informations visuelles et olfactives (Sun *et al.*, 2020). Ce comportement est en partie régulée par l'activité des neurones γ des CPs (Sun *et al.*, 2020). De plus, le système sérotoninergique semble avoir un rôle prépondérant dans la motivation à interagir avec les autres (Sun *et al.*, 2020).

B. Le comportement d'agressivité

L'agressivité est un comportement avec une composante innée et acquise, retrouvé chez un grand nombre d'espèces animales et d'insectes comme la drosophile. Elle permet à un individu de s'approprier ou de défendre une ressource indispensable à sa survie ou sa reproduction, telle que la nourriture, un partenaire sexuel ou encore un territoire et permet d'établir des liens de hiérarchie au sein d'un groupe. Ce comportement se retrouve aussi bien chez les mâles que chez les femelles drosophiles avec des séquences comportementales stéréotypées spécifiques à chaque sexe (Nilsen *et al.*, 2004) (Fig.I11).

Initialement décrit par Sturtevant (1915), le comportement d'agressivité inter-mâles pour défendre un territoire, l'accès à la nourriture ou un partenaire sexuel peut se décomposer en plusieurs étapes stéréotypées (Fig.I11). Une phase d'approche (a), des menaces visuelles en levant les ailes à 45°, appelées threats (b), des attaques physiques en levant les pattes prothoraciques, appelées lunges (c) et une phase où les individus se lèvent sur leurs pattes postérieures et se donnent de multiples coups violents, appelée tussling (d) (Fig.I11). Le lunge est l'élément prépondérant du comportement d'agressivité entre mâles (Chowdhury *et al.*, 2021) inexistant chez les femelles. Il permet l'établissement de liens de dominance (Nilsen *et al.*, 2004). Ces schémas comportementaux sont modulables, conférant à l'individu une certaine adaptabilité, permettant ainsi l'émergence de nouvelles stratégies de combat (Kravitz et Fernandez, 2015).

Ces différentes phases du comportement d'agressivité peuvent permettre d'évaluer l'intensité des combats, ainsi que l'escalade de la violence. Les phases de tussling reflètent souvent une hyperagressivité ; les threats montrent plutôt une faible intensité d'agressivité. Les lunges sont généralement des indices d'une forte agressivité.

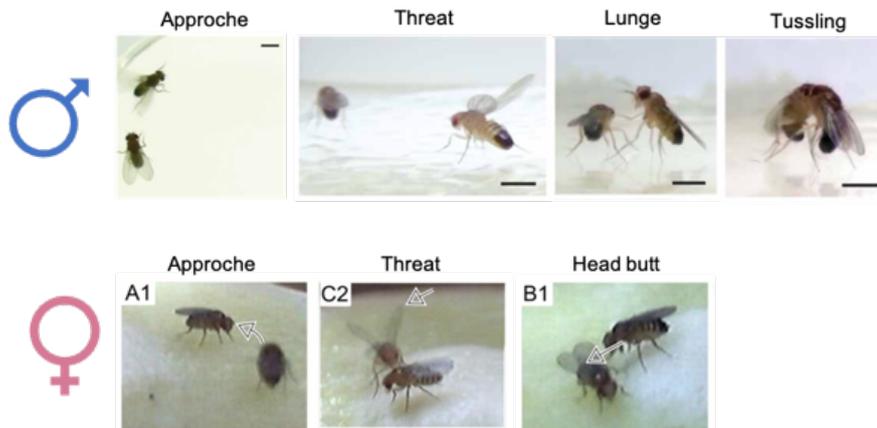


Fig. I11 : Principales étapes du comportement d'agressivité sexe spécifique.

Les photos représentent les principales phases du comportement d'agressivité. Chez les mâles, comme chez les femelles, il existe une phase d'approche et des menaces visuelles qui sont appelées « threat ». Les attaques physiques sont différentes en fonction du sexe, chez les mâles il existe des attaques de faible intensité sont appelées « lunges » et celles de forte intensité sont appelées « tussling ». Chez les femelles les menaces physiques sont appelées « head butt ». Ces séquences sont modulables et peuvent apparaître dans des ordres différents avec des probabilités différentes suivant le contexte (environnemental et statut interne de l'individu). Modifiée d'après Dankert et al., 2009 ; Ueda et Wu, 2009.

a. Les dérivés d'AAs, les CPs et la régulation de l'agressivité

Chez la drosophile, de multiples dérivés d'AAs interviennent dans la modulation du comportement d'agressivité. La sérotonine (dérivée du tryptophane) sécrétée par une paire symétrique de neurones localisés dans le protocerebrum latéral postérieur, les neurones 5HT-PLP, a été identifiée pour intervenir dans l'escalade de l'agressivité (Alekseyenko *et al.*, 2014). De plus, le signal sérotoninergique arrivant aux IPCs via le récepteur 5HT1A stimule les lunges et les threats (Luo *et al.*, 2014). L'octopamine (dérivée de la tyrosine), apparentée à la norepinephrine est considérée comme la majeure neurohormone de fuite/combat chez les invertébrés, intervient également dans la modulation de l'agressivité (Hoyer *et al.*, 2008 ; Certel *et al.*, 2010 ; Luo *et al.*, 2014 ; Ishii *et al.*, 2022). Le signal octopaminergique reçu par les IPCs via le récepteur OAMB est indispensable pour la modulation des comportements d'agressivité (threats et lunges) (Luo *et al.*, 2014). Des neurones tyraminergique/octopaminergique sont impliqués dans la régulation de l'agressivité induite par l'isolement social (Ishii *et al.*, 2022). Une voie glutamatergique a également été identifiée dans la régulation de ce comportement, en impliquant le récepteur NMDAR1 (Zwarts *et al.*, 2011). La dopamine, synthétisée à partir de la tyrosine, est également impliquée dans la régulation de l'agressivité (Alekseyenko *et al.*, 2013).

Ainsi, l'apport d'AAs pour la synthèse de ces neuropeptides semble importante pour la modulation de l'agressivité. Il est possible que des défaillances de leur

transport au sein des neurones ou des cellules gliales puissent impacter le comportement d'agressivité.

De plus, comme cité précédemment, les CPs sont également impliqués dans le comportement d'agressivité (Baier *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2009 ; Zwarts *et al.*, 2011 ; Chouhan *et al.*, 2017). Des changements morphologiques des CPs sont observés chez des individus hyperagressifs de lignées avec insertion d'élément P (Zwarts *et al.*, 2011). L'implication de l'adénylate cyclase (Rutabaga, Rut) et de la phosphodiesterase (Dunce, Dnc) dans les CPs et le complexe central ont été mises en évidence comme médiateurs de la plasticité comportementale nécessaire à l'établir des relations de dominance lors du combat (Chouhan *et al.*, 2017). Les drosophiles mutantes pour *Rut* et *Dnc* semblent incapables de modifier leurs stratégies de combat et d'établir des relations de dominance (Chouhan *et al.*, 2017). De plus, les neurones octopaminergiques Anterior Paired Lateral (APL) modulent l'activité des lobes α' / β' via les récepteurs octopaminergiques Oct β 2R (Wu *et al.*, 2013).

Ces études montrent l'implication des corps pédonculés dans le contrôle de l'agressivité. Ainsi, l'étude de la fonction de HATs au sein des CPs dans le contrôle de ce comportement pourrait permettre d'éclaircir la fonction de MND, transporteur d'acides aminés.

b. Régulation de l'agressivité par le système chimio sensoriel

La détection des phéromones ou odeurs de nourriture par le système chimio sensoriel (organes olfactifs et gustatif) modifie également l'agressivité des individus (Hoopfer, 2016). Une phéromone produite par les mâles, le 11-*cis*-Vaccenyl Acétate (cVA) peut avoir deux actions opposées sur l'agressivité. D'une part, le cVA active les neurones sensoriels olfactifs exprimant le récepteur OR65a induisant une inhibition de l'agressivité entre mâles (Liu *et al.*, 2011). D'autre part, le cVA peut se fixer sur les neurones sensoriels olfactifs exprimant le récepteur OR67d pour stimuler l'agressivité entre mâles (Wang et Anderson, 2010 ; Liu *et al.*, 2011). De plus, des neurones gustatifs sont impliqués dans la détection de phéromones notamment sexuelles, comme le récepteur gustatif GR32a qui détecte le 7-T et promeut un comportement d'agressivité (Wang *et al.*, 2011). La nourriture peut également avoir un rôle sur le comportement d'agressivité. En effet, le sucrose active des neurones gustatifs exprimant GR5a qui stimulent alors l'agressivité (Lim *et al.*, 2014).

c. Impact de l'isolement social sur l'agressivité

L'isolement social à l'âge adulte est un facteur de stress chez les mammifères (Matsumoto *et al.*, 2005 ; Takahashi, 2022) comme chez les drosophiles (Vora *et al.*, 2022). Ce stress induit une augmentation des comportements d'agressivité. En 2020, Agrawal et collaborateurs ont mis en évidence le rôle crucial du neuropeptide drosulfakinin dans l'augmentation de l'agressivité lié à l'isolement social. Inhiber ou activer les neurones sécrétant la drosulfakinin, dont les IPCs font parties, chez les individus isolés augmente leurs comportements agressifs, mais ne semblent pas moduler l'agressivité chez les individus groupés. De plus, des neurones octopaminergiques semblent nécessaires à la régulation de l'agressivité induite par l'isolement social (Ishii *et al.*, 2022).

d. Régulation de l'agressivité par le statut nutritionnel

Il a été démontré par Legros et collaborateurs (2021) que la restriction à long-terme de nutriments, notamment les molécules sucrées, modifient les schémas comportementaux d'agressivité menant à l'émergence de stratégies de combat différentes. Les individus élevés sans restriction privilégient les attaques physiques (lunges) afin de maintenir leur statut de dominant. *A contrario*, les individus maintenus sur une source de nourriture pauvre en molécules sucrées utilisent les menaces visuelles et physiques pour établir un lien de dominance et privilégie les threats pour maintenir ce statut. Ces résultats soulignent les effets du régime alimentaire sur l'adaptabilité des stratégies de combats. De plus, la voie des DILPs a été identifiée pour moduler l'agressivité (Agrawal *et al.*, 2020 ; Luo *et al.*, 2014) démontrant une connexion directe entre l'état nutritionnel interne de l'individu et la régulation de son comportement. La disponibilité des ressources nutritionnelles joue également un rôle dans la modulation des comportements agressifs (Kilgour *et al.*, 2020). De plus, le neuropeptide F impliqué dans le contrôle de la faim (homologue du neuropeptide Y chez les mammifères) est impliqué dans l'inhibition de l'agressivité (Dierick et Greenspan, 2007) et les CPs sont modulés par des signaux de faim et de satiété (Tsao *et al.*, 2018).

e. *L'implication de la mémoire et l'apprentissage*

Il a été mis en évidence l'établissement de relations de dominance et une modification des stratégies d'agressivité en fonction des expériences passées. (Yurkovic *et al.*, 2006 ; Trannoy *et al.*, 2017 ; Chouhan *et al.*, 2017). Les drosophiles mutantes pour *Rut* et *Dnc* au sein des CPs (notamment KCa/β et γ) semblent incapables de modifier leurs stratégies de combat et d'établir des relations de dominance (Chouhan *et al.*, 2017), suggérant l'implication de la formation de mémoire pour ajuster la stratégie de combat. En effet, les individus peuvent garder en mémoire leurs expériences passées et apprendre de celles-ci (Trannoy *et al.*, 2017 ; Kilgour *et al.*, 2020). Les individus établissant une relation de dominance ont plus de probabilité de gagner les prochains combats, et inversement, les individus perdant un combat ont plus de chance de perdre les suivants. Ce phénomène est appelé l'effet « loser ». De la même manière, le gagnant a une plus grande probabilité de gagner le prochain combat (Trannoy *et al.*, 2017). Cela souligne l'implication de la mémoire et de l'apprentissage des expériences passées dans le comportement d'agressivité et montre un rôle prépondérant des CPs dans la modulation du comportement d'agressivité.

f. *Implication de SLC dans l'agressivité*

De manière intéressante, une étude semble montrer l'implication d'un transporteur d'acides aminés de type SLC dans la régulation de l'agressivité chez la drosophile. Chowdhury et collaborateurs (2017) montrent que la dérégulation de *mahogany*, potentiel SLC, au sein des neurones induit un phénotype d'hyperagressivité, où les individus vont plus rapidement initier un comportement agressif, effectuer plus de lunges et vont statistiquement gagner plus leur combat contre des individus témoins. *mahogany* pourrait appartenir à la famille des SLC32A (Flybase) qui sont impliqués dans le transport vésiculaire de GABA ou appartiendrait à la famille des SLC38A (Flybase) qui sont des transporteurs d'acides aminés neutres Na^+ dépendants (Ceder et Fredriksson, 2022). Les SLC38A sont exprimés dans un grand nombre de tissus dont le système nerveux chez la souris (Sundberg *et al.*, 2007). SLC38A8 semblent jouer un rôle important dans le transport de glutamine intervenant dans le cycle glutamine / glutamate au sein du cerveau, dans lequel la glutamine sert à réguler les réserves de glutamate et de GABA dans les terminaisons nerveuses (Hägglund *et al.*, 2015). Un autre membre de cette famille, SLC38A6 est spécifiquement

localisé au niveau des membranes synaptiques des neurones glutamatergiques (Bagchi *et al.*, 2014).

Les transporteurs d'acides aminés de la famille des SLC dans les neurones sont donc corrélés au bon fonctionnement du SNC et peuvent ainsi moduler des fonctions cognitives et des comportements complexes comme l'agressivité. Les SLC7A de type LAT sont largement exprimés au sein du SNC mais leur implication dans le fonctionnement du tissu nerveux n'est pas totalement élucidée.

Objectifs de la thèse

Cette première partie de ce manuscrit de thèse a permis d'introduire l'importance des transporteurs d'acides aminés hétérodimériques dans la physiologie des cellules et des organismes. Ces protéines ont des fonctions cruciales pour maintenir l'homéostasie interne des cellules, incluant les neurones et les cellules gliales. Ils sont impliqués dans de nombreuses maladies humaines métaboliques et neuronales. Certains de ces transporteurs sont devenus des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement de ces maladies. L'étude de leurs fonctions au sein des neurones est un enjeu majeur afin de développer des thérapies efficaces et mieux appréhender leurs potentiels effets secondaires. Mieux comprendre leur implication dans la régulation des comportements sociaux pourrait permettre d'améliorer la compréhension du développement de certaines maladies comme l'autisme. L'utilisation du modèle *Drosophila melanogaster* permet d'investiguer ces questions.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier la fonction de MND dans le fonctionnement du système nerveux central chez la drosophile adulte. Potentiel orthologue de SLC7A5 des mammifères, MND a été décrit comme faisant partie des transporteurs hétérodimériques d'acides aminés de type LAT. Cette chaîne légère transporterait la leucine (Reynolds et al., 2009), un EAA qui joue des fonctions importantes dans les cellules. La fonction de MND a été décrite chez la larve, en particulier dans le contrôle de la libération des DILPs en présence de leucine au sein des IPCs afin de réguler le métabolisme (Manière *et al.* 2016). De plus, MND participe à la régulation du sommeil au sein des cellules gliales (Li *et al.*, 2023) et des neurones dopaminergiques (Aboudhief *et al.*, 2018). MND a été décrit dans le laboratoire comme étant présent dans les neurones des corps pédonculés (Simonnet, 2015) structure neuronale centrale dans la gestion des informations sensorielles et l'élaboration de comportements complexes. De ce point de vue, l'étude de l'activité des neurones des CPs et les comportements associées pourrait permettre d'élucider les fonctions de MND.

Premièrement, nous avons cherché à identifier la nature des neurones des corps pédonculés où *mnd* est exprimé. La caractérisation des cellules des différents lobes dans lesquels MND est présente est un préalable indispensable pour déterminer la fonction de MND dans ces cellules.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer la fonction de MND dans ces neurones spécifiques. L'imagerie calcique fonctionnelle a été utilisée pour étudier l'activité de ces neurones en présence d'acides aminés et l'implication de MND dans ces réponses, ainsi que les voies intracellulaires impliquées.

Troisièmement, nous avons cherché à caractériser le rôle de MND dans la réponse au glutamate des corps pédonculés. MND est-il impliqué dans la régulation du transport ou des récepteurs au glutamate dans les corps pédonculés ?

Quatrièmement, nous avons cherché à déterminer quelles pouvaient être les implications comportementales de l'action de MND dans les neurones des CPs. Nous avons essayé de déterminer si MND ou la réponse MND-dépendante des CPs aux acides aminés étaient des facteurs clés dans le contrôle de comportements sociaux contrôlés par les corps pédonculés, comme l'agressivité et l'attraction sociale.

Pour résumer, les objectifs de ma thèse étaient de déterminer le rôle de MND dans les corps pédonculés à différents niveaux : au niveau cellulaire, déterminer le rôle de MND dans la réponse aux AAs et les voies de signalisation impliquées ; au niveau comportemental, déterminer les rôles de MND dans des comportements sociaux associés aux corps pédonculés.

Chapitre 2

Matériel
&
Méthodes

1. Le modèle *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, aussi appelée la mouche du vinaigre, est une espèce de diptère, du genre *Drosophila*, holométabole (métamorphose complète), qui est utilisée comme modèle biologique depuis le début du XX^{ème} siècle. C'est un organisme d'une grande simplicité d'élevage, de par sa petite taille (3 à 4 mm de long), ses demandes nutritionnelles peu onéreuses, et son cycle de vie relativement court, 10 jours à 25°C (Fig.M1). De plus, la capacité des femelles à pondre environ 2000 œufs au cours de leur vie donne la possibilité de générer un grand nombre d'individus rapidement, ce qui permet d'avoir une grande force statistique. Le génome de cet organisme est parmi les premiers à avoir été totalement séquencé, assemblé et annoté (Adams *et al.*, 2000). Il est composé de 4 paires de chromosomes, une paire de chromosome sexuel X et Y, et 3 paires d'autosomes, portant environ 13 600 gènes (Adams *et al.*, 2000), dont la plupart trouvent des orthologues chez les vertébrés (Reiter *et al.*, 2001).

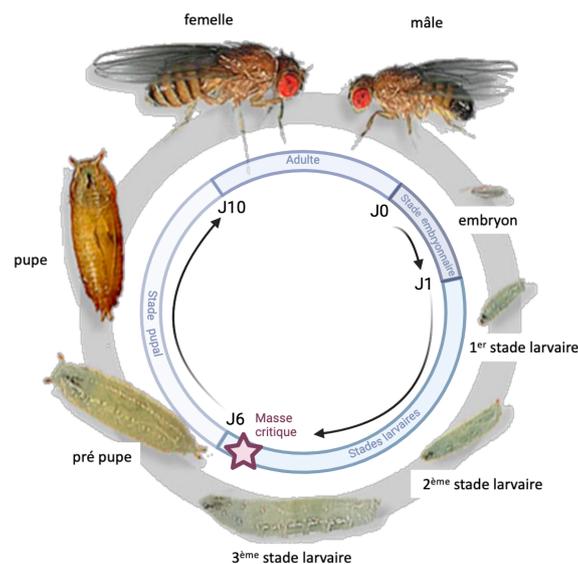


Fig. M1 : Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*.

Le cycle de génération de l'œuf à l'imago (femelles et mâles) dure environ 10 jours à 25°C (Stocker et Gallant, 2008). Il comprend 3 stades larvaires qui grandissent par mues successives, et qui sont majoritairement des phases où la larve se nourrit afin d'atteindre une masse critique (d'environ 3mg, Mirth *et al.*, 2005) déclenchant le début de la métamorphose par la formation du puparium, et s'achevant par la génération d'un imago. Il faut environ 4 jours à des œufs fraîchement pondus pour devenir une larve de stade 3, et il faut 2 jours supplémentaires pour atteindre la masse critique et devenir une prépupe (J6). La métamorphose se fait à l'intérieur du puparium, et dure environ 4 jours au terme de laquelle va émerger une drosophile, qui va atteindre sa maturité sexuelle 16h après son éclosion et pouvoir recommencer le cycle. Figure modifiée d'après le site Flymove (<http://flymove.uni-muenster.de/>).

A. Entretien des lignées de *Drosophila melanogaster*.

Les drosophiles (*D. melanogaster*) sont élevées dans des tubes en polystyrène transparent standard, de 25 mm de diamètre et 95 mm de long, distribués par Dutscher (STIRILAB #789008). Ces tubes sont remplis d'environ 20 à 30 mm de nourriture standard, et fermés à l'aide de bouchons d'acétate de cellulose à tissage dense pour limiter les infestations d'acariens, distribué par Genese Scientific (Flystuff #49-12 Flugs). Les lignées sont maintenues dans des incubateurs (MIR-554-PE de pHcbi ou Panasonic) à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, et un taux d'hygrométrie relative de $60\% \pm 10\%$. Le cycle jour/nuit est artificiellement créé par des bandes LEDs (α lphesus #19C1003A ou #15C1003B) simulant la lumière blanche du soleil, réglé sur un cycle 12h lumière/12h obscurité. Afin de pérenniser les lignées, le milieu nutritif est changé tous les 15 jours si les drosophiles sont élevées à 25°C , ou toutes les 3 à 4 semaines pour les élevages maintenus à 18°C (stock). Pour les croisements expérimentaux, les individus sont transférés sur un nouveau milieu tous les 2 à 3 jours.

La nourriture standard est composée de 0,065g/mL de farine de maïs (Eurogerm), 0,065g/mL de levure de bière : *Saccharomyces cerevisiae* (MP Biomédicals, #903312), 0,009g/mL d'agar agar (Labover biotech-KALYS, #HP697-5) et d'eau. Le mélange est chauffé afin de faire bouillir l'agar permettant, en refroidissant, sa polymérisation. Avant la polymérisation, aux alentours de 60°C , un antifongique, le tegosept (Methyl 4-hydroxybenzoate), est ajouté (3,1%, Apex Bioresearch Products, #20-258, distribué par Genesee Scientific), afin de limiter les contaminations fongiques.

B. Outils génétiques.

a. Le système d'ARN interférent.

Une des stratégies développées pour étudier la fonction d'un gène est de diminuer le nombre de protéine traduite en dégradant leur ARNm, en utilisant un ARN interférent (Jorgensen, 1990). C'est un ARN double brin (ARNds), complémentaire de l'ARNm cible, que l'on va faire s'exprimer dans les cellules d'intérêt. Ces ARNds vont être pris en charge par la ribonucléase DICER, qui va les cliver pour former des ARNs simple brins (ARNsi). Les ARNsi vont servir à DICER de « guide » afin de s'hybrider de manière complémentaire aux ARNs cibles. Une fois hybridé, l'ARN cible est clivé puis dégradé. Cela diminue ainsi drastiquement le

nombre d'ARNm d'un gène cible. Ainsi, ce système permet de réduire la production d'une protéine cible en diminuant la quantité d'ARNm correspondant (Fig.M2).

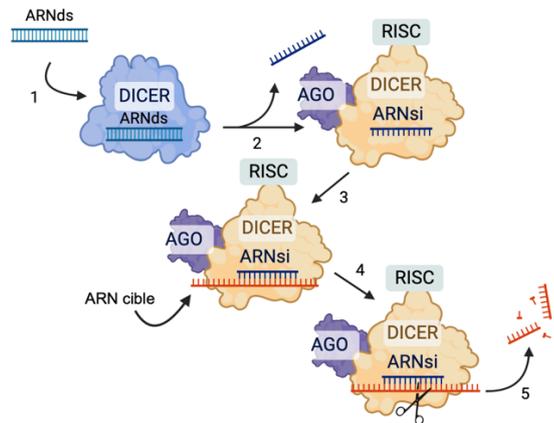


Fig. M2 : Schéma du processus d'ARN interférence.

Ce mécanisme cellulaire peut être utilisé afin de dégrader des ARNs d'intérêts et se décompose en 5 grandes étapes : 1- Un ARN double brin (ARNds) est fixé par DICER. 2- DICER clive le ARNds en ARN simple brin (ARNsi), et va s'associer à la protéine ARGONAUTE (AGO) pour former le complexe RISC. 3 - Par la complémentarité de base du ARNsi que RISC porte, il va s'hybrider avec un ARN cible. 4 - Le complexe RISC clive l'ARN cible. 5 - L'ARN est dégradé et ne peut plus être traduit. (Schéma inspiré du site web de l'IBMC, équipe du Dr Meignin : <https://ibmc.cnrs.fr/laboratoire/m3i/equipes/arn-interference-et-recepteurs/>, créé grâce à Biorender)

b. Le système Gal4/UAS

L'étude de l'expression des gènes est indispensable pour comprendre leur fonction, et leur implication dans divers processus cellulaires, physiologiques et comportementaux. En général, un gène est composé de différents éléments, notamment une/des séquence(s) régulatrice(s) en amont, une région promotrice, et une séquence codant une protéine. La découverte du système Gal4/UAS chez la levure par Hitoshi Kakidani, Mark Ptashne, Nicholas Webster et Pierre Chambon en 1988 a permis de développer des outils génétiques puissants, notamment chez la drosophile grâce à Andrea Brand et Norbert Perrimon en 1993. Ce système bipartite est composé d'une séquence codant un facteur de transcription nommé Gal4, qui se fixe sur une séquence régulatrice appelée Upstream Activation Sequence (UAS), contrôlant l'expression du gène en aval de cette séquence UAS (Fig.M3). Ainsi, il est possible, en créant un transgène avec une séquence régulatrice d'un gène d'intérêt en amont de la séquence codante pour Gal4, d'exprimer ce facteur de transcription de manière tissu spécifique. GAL4 va alors pouvoir se fixer sur la séquence UAS des transgènes, comme des rapporteurs tel que des protéines fluorescentes comme la GFP, la RFP ou la GCaMP6s ou encore des ARN interférents permettant de diminuer le nombre d'ARNm d'un gène et donc de diminuer sa traduction en protéine. En étudiant la

diminution de la protéine (Knock Down) cela permet de leur imputer certaines fonctions. Le fait que ce système soit exogène à la drosophile permet de ne pas avoir d'autre cible que les transgènes, et cela ne va pas moduler l'expression des gènes endogènes à la drosophile.

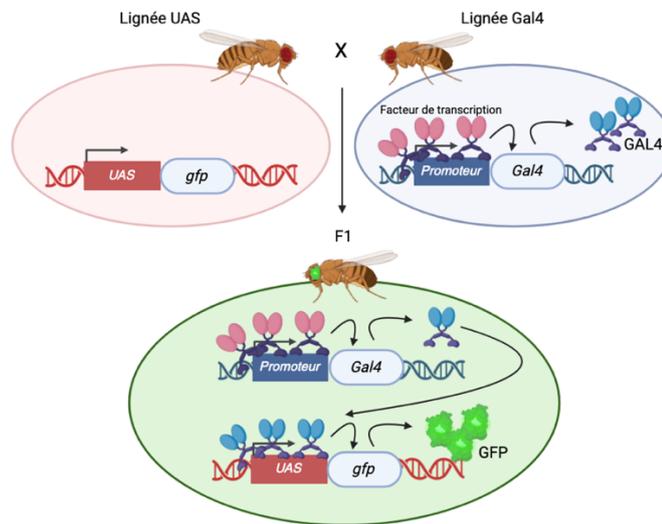


Fig. M3 : Schéma d'expression Gal4/UAS.

Une lignée porte un transgène composé de la séquence régulatrice UAS en amont d'un gène d'intérêt, ici un gène rapporteur comme la *gfp*. Cette lignée est croisée avec une autre lignée portant un autre transgène, composé de la séquence du gène codant le facteur de transcription GAL4 en aval d'un promoteur choisi, celui d'un gène exprimé uniquement dans l'œil par exemple. Les descendants F1 de ce croisement posséderont les deux transgènes dans leur génome. Le facteur de transcription GAL4 ne s'exprimera que dans les cellules d'œil et se fixera sur sa séquence cible UAS permettant l'expression du gène d'intérêt situé en aval de l'UAS, ici *gfp*. Ainsi, la GFP est produite uniquement dans les cellules de l'œil. (Schéma inspiré du site web du laboratoire du Dr Brand : <https://andreabrandlab.org/gal-4-system>, créé grâce à Biorender)

c. Le système LexA/LexAop.

Ce système est semblable au système Gal4/UAS. *LexA* étant la séquence codante du facteur de transcription *LexA*, et *LexAop* la séquence régulatrice sur laquelle *LexA* peut se fixer et ainsi induire l'expression du gène en aval (Kockel *et al.*, 2016 ; O'Kane et Gehring 1987). Ce système provient de la bactérie *Escherichia Coli* et est totalement indépendant du système Gal4/UAS. Ainsi, il est possible d'introduire les deux systèmes simultanément chez *Drosophila melanogaster* permettant notamment de faire de l'intersection d'expression génétique. De même que le système Gal4/UAS, le système *LexA/LexAop* est exogène à la drosophile et ne va pas modifier l'expression génétique endogène.

d. L'intersection d'expression génétique.

Cette stratégie d'intersection d'expression génétique met en jeu différents outils génétiques : les deux systèmes d'expression Gal4/UAS et LexA/LexAop, le système FRT/flp et un codon stop. La combinaison de ces trois systèmes permet d'exprimer un transgène d'intérêt (rapporteur GFP ou ARNi ou autre) uniquement dans les cellules communes (intersection) des deux drivers d'expression Gal4 et LexA. La séquence FRT-STOP-FRT est placée en aval de la séquence UAS et en amont d'un gène d'intérêt. Le codon stop ne sera excisé par la flippase (flp), qui cible les séquences FRT, que dans les cellules qui expriment à la fois LexA et GAL4. Le gène d'intérêt ne sera donc exprimé que dans les cellules qui sont GAL4 et LexA positives. Ainsi, il ne sera pas exprimé dans les autres cellules, mêmes celles qui n'expriment que le GAL4 ou le LexA (Fig.M4).

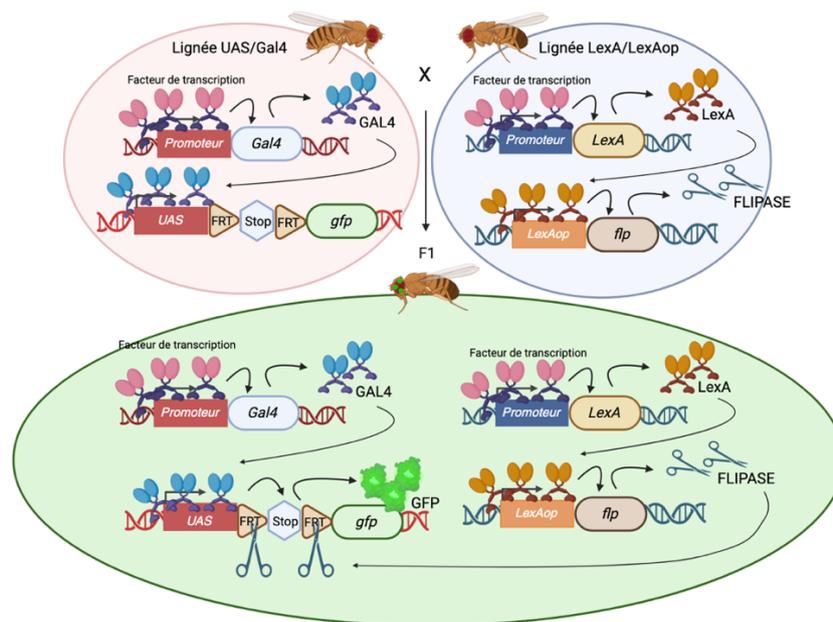


Fig. M4 : Schéma d'expression grâce à l'intersection d'expression génétique.

Dans les cellules qui expriment à la fois le GAL4 et LexA, le facteur de transcription LexA va permettre la transcription de la flippase. Cette enzyme va ensuite cibler ses séquences cibles FRT qui encadrent un codon STOP. Le codon STOP est alors excisé. Le facteur de transcription GAL4 va alors se fixer sur sa séquence cible UAS. En l'absence du codon stop, le gène d'intérêt situé en aval va être transcrit. Seules les cellules exprimant à la fois le LexA et GAL4 vont exprimer le gène d'intérêt, ici la gfp. Les cellules qui n'expriment que le LexA exprimeront l'enzyme flippase qui va exciser le codon stop mais comme ces cellules n'expriment pas le GAL4, il n'y a pas d'expression du gène d'intérêt. Dans les cellules qui expriment uniquement le GAL4, l'expression du gène d'intérêt ne se fait pas car le codon stop est toujours présent en l'absence de LexA. (Schéma créé grâce à Biorender.)

C. Les différentes lignées *Drosophila melanogaster* utilisées.

La lignée considérée comme référence dans les laboratoires est la lignée *white*¹¹¹⁸ (*w*¹¹¹⁸). Cette lignée aux yeux blancs porte une mutation sur le gène *white* codant un transporteur ABC, le rendant non fonctionnel, impliqué dans le transport de pigments (Mackenzie *et al.*, 1999) et rendant les individus aveugles. Le fond génétique des lignées transgéniques utilisées le plus souvent est celui de la *w*¹¹¹⁸. C'est pourquoi cette lignée a été utilisée comme témoin pour un certain nombre d'expériences au cours de ma thèse. Cependant la mutation affectant le gène *white* induit une cécité visuelle des individus, ce qui est problématique lors d'études comportementales. Une autre lignée de *D. melanogaster* est alors utilisée comme référence pour les tests comportementaux, la lignée Canton Spéciale (*Canton S*, *CS*). Cette lignée aux yeux rouges sans aucun défaut visuel est donc la plus utilisée en étude comportementale. De plus, le fond génétique des lignées est très important. Pour que les résultats soient interprétables, il faut que toutes les lignées utilisées aient le même fond génétique. En effet, le fond génétique peut influencer le cycle de vie, le métabolisme et la physiologie des individus (Zimmerman *et al.*, 2012 ; Zarubin *et al.*, 2020). J'ai donc retro-croisé sur cinq générations mes lignées d'intérêt (qui portent un transgène couplé à un rapporteur : ici le gène *white*) avec la lignée Canton S modifiée (*white*^{-/-} ; *Canton S*). Toutes les lignées utilisées en comportement ont donc un fond génétique « cantonisées » et possèdent les yeux rouges.

Les lignées utilisées avec le système Gal4/UAS sont listés dans les tableaux suivants : Tableau I : Lignées Gal4, Tableau II : Lignées UAS et Tableau III : Lignées UAS utilisées pour induire de l'ARN interférence.

Tableau I : Lignées de drosophiles portant un transgène Gal4.

Fournisseur	Reference	Transgène	Génotype	Expression
Bloomington	#7362	<i>c739-Gal4</i>	<i>y[1] w[67c23];</i> <i>P{w[+mW.hs]=GawB}Hr39[c739]</i>	Toutes les KC α / β
Bloomington	#30829	<i>c305a-Gal4</i>	<i>w[*];</i> <i>P{w[+mW.hs]=GawB}Cka[c305a]</i>	Toutes les KC α' / β'
Bloomington	#51632	<i>H24-Gal4</i>	<i>P{w[+mW.hs]=GawB}H24</i>	Toutes les KC γ , corps ellipsoïde, LA, SEZ

Bloomington	#854	OK107-Gal4	$w[*]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}OK107$ $ey[OK107]/In(4)ci[D], ci[D]$ $pan[ciD] sv[spa-pol]$	Toutes les KCs, neurones de la PI, et des LO
Serge Birman / VDRC	#206077	VT30559- Gal4	$P\{w[+mW.hs]=GawB\}VT30559$ $attP2$	Toutes les KCs
CSGA, eq Grosjean		$mnd^{24-1}-Gal4$	$pGEM-T mnd^{24-1} attP2$	Neurones mnd positifs
CSGA, eq Grosjean		$mnd^{25-1}-Gal4$	$pGEM-T mnd^{25-1} attP40$	Cellules gliales mnd positives
CSGA, eq Grosjean		$mnd^{26-1}-Gal4$	$pGEM-T mnd^{26-1} attP2$	Cellules des LO mnd positives
CSGA, eq Grosjean		$mnd^{27-1}-Gal4$	$pGEM-T mnd^{27-1} attP2$	Neurones et cellules gliales mnd positives
Kondo <i>et al.</i> , 2020		$NmdaR1-$ $Gal4$	$TI\{2A-GAL4\}NmdaR1[2A-C.GAL4]$ $w[*]$	Cellules $NmdaR1$ positives
Kondo <i>et al.</i> , 2020		$NmdaR2-$ $Gal4$	$TI\{2A-GAL4\}NmdaR2[2A-C.GAL4]$ $w[*]$	Cellules $NmdaR2$ positives
Kondo <i>et al.</i> , 2020		$KaiR1D-Gal4$	$TI\{2A-GAL4\}KaiR1D[2A-C.GAL4]$ $w[*]$	Cellules $KaiR1D$ positives
Kondo <i>et al.</i> , 2020		$GluCl\alpha-Gal4$	$TI\{2A-GAL4\}GluCl\alpha[2A-C.GAL4]$ $w[*]$	Cellules $GluCl\alpha$ positives
Kondo <i>et al.</i> , 2020		$mGluR-Gal4$	$TI\{2A-GAL4\}mGluR[2A-C.GAL4]$ $w[*]$	Cellules $mGluR$ positives
Bloomington	#8760	$Elav-Gal4$	$P\{w[+mC]=GAL4-elav.L\}/TM6$	Neurones
Bloomington	#478	$Elav-Gal4$	$P\{w[+mW.hs]=GawB\}elav[C155]$	Neurones
Bloomington	#7415	$Repo-Gal4$	$Df(3R)BSC43, st[1] ca[1]/TM2, p[p]$	Cellules gliales

Tableau II : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation UAS.

Fournisseur	Reference	Transgène	Génotype	Expression
Bloomington	#32193	UAS- $mCD8::GFP$	$w[*]; P\{y[+t7.7] w[+mC]=15XUAS-$ $IVS-mCD8::GFP\}attP2$	GFP membranaire
Bloomington	#32186	UAS- $mCD8::GFP$	$w[*]; P\{y[+t7.7] w[+mC]=10XUAS-$ $IVS-mCD8::GFP\}attP40/CyO;$ $TM2/MT6b$	GFP membranaire
Bloomington	#4776	UAS- $nls::GFP$	$w[1118]; P\{w[+mC]=UAS-$ $GFP.nls\}8$	GFP nucléaire

Bloomington	#38425	<i>UAS-nls::mcherry</i>	$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-mCherry.NLS\}2; MKRS/TM6B, Tb[1]$	RFP nucléaire
Bloomington	#38424	<i>UAS-nls::mcherry</i>	$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-mCherry.NLS\}3$	RFP nucléaire
Bloomington	#27391	<i>UAS-mCD8::RFP</i>	$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-mCD8.ChRFP\}2$	RFP membranaire
Bloomington	#30125	<i>UASfrtSTOP frtmCD8::GFP</i>	$y[1] w[1118]; P\{w[+mC]=UAS(FRT.stop)mCD8-GFP.H\}11/CyO$	GFP membranaire
Bloomington	#42748	<i>UAS-GCaMP6s</i>	$w[1118]; P\{y[+t7.7] w[+mC]=20XUAS-IVS-GCaMP6s\}attP40$	Senseur calcique GCaMP6s
CSGA, eq Grosjean		<i>UAS-mnd</i>	$p]FRC7mnd^{24-1} attP16$	Surexpression de <i>mnd</i>
VDRC	#60009	<i>UAS-Dicer2</i>	$w[1118]; P\{UAS-dicer2, w[+]\}$	Expression <i>Dicer2</i>

Tableau III : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation UAS permettant l'expression d'un ARN interférent.

Fournisseur	Reference	Transgène	Génotype	Expression
VDRC	#110217	<i>UAS-mnd^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK102686\}VIE-260B$	Inhibition de <i>mnd</i>
Bloomington	#62207	<i>UAS-mnd^{dsRNABL}</i>	$y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P\{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05214\}attP40$	Inhibition de <i>mnd</i>
VDRC	#104773	<i>UAS-NmdaR1^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK107519\}VIE-260B$	Inhibition de <i>NmdaR1</i>
VDRC	#12189	<i>UAS-NmdaR2^{dsRNA^{GD}}</i>	$w1118; P\{GD3192\}v12187/CyO$	Inhibition de <i>NmdaR2</i>
VDRC	#103736	<i>UAS-mGluR^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK102270\}VIE-260B$	Inhibition de <i>NmdaR2</i>
VDRC	#105754	<i>UAS-GluClα^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK109167\}VIE-260B$	Inhibition de <i>GluClα</i>
VDRC	#110201	<i>UAS-KaiR1D^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK102490\}VIE-260B$	Inhibition de <i>KaiR1D</i>
Bloomington	#7013	<i>UAS-Tor^{TED}</i>	$y1 w^*; mTor\Delta P\{neoFRT\}40A/CyO$	Inhibition de <i>Tor</i>
Bloomington	#34639	<i>UAS-Tor^{dsRNA}</i>	$y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P\{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01114\}attP2$	Inhibition de <i>Tor</i>
Bloomington	#33951	<i>UAS-Tor^{dsRNA}</i>	$y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P\{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00904\}attP2$	Inhibition de <i>Tor</i>
VDRC	#109499	<i>UAS-gdh^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK107890\}VIE-260B$	Inhibition de <i>gdh</i>
VDRC	#100271	<i>UAS-homer^{dsRNA^{kk}}</i>	$w[*]; P\{KK107359\}VIE-260B$	Inhibition de <i>homer</i>

Les lignées utilisées avec le système LexA/LexAop sont listées dans les tableaux suivants : Tableau IV : Lignées LexA, Tableau V : Lignées LexAop.

Tableau IV : Lignées de drosophiles portant un transgène LexA.

Fournisseur	Reference	Transgène	Génotype	Expression
CSGA, eq Grosjean		<i>mnd²⁴⁻¹-LexA</i>	<i>pBLnlsLexA::GAD mnd²⁴⁻¹ attP2</i>	
Deng <i>et al.</i> , 2019		<i>NmdaR1-LexA</i>	<i>TI{2A-lexA::GAD}Nmdar1[2A-C.lexA] w[*]</i>	Cellules <i>NmdaR1</i> positives
Deng <i>et al.</i> , 2019/ Bloomington	#84421	<i>NmdaR2-LexA</i>	<i>TI{2A-lexA::GAD}Nmdar2[2A-C.lexA] w[*]</i>	Cellules <i>NmdaR2</i> positives

Tableau V : Lignées de drosophiles portant un transgène contenant une séquence d'activation LexAop.

Fournisseur	Reference	Transgène	Génotype	Expression
Bloomington	#55819	<i>LexAop2-FLP</i>	<i>w[1118]; P{y[+t7.7] w[+mC]=8XLexAop2-FLPL}attP2</i>	Flippase
Bloomington	#32203	<i>LexAop-mCD8::GFP</i>	<i>w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=13XLexAop2-mCD8::GFP}attP2</i>	GFP membranaire
Bloomington	#32205	<i>LexAop-mCD8::GFP</i>	<i>w[*]; P{y[+t7.7] w[+mC]=13XLexAop2-mCD8::GFP}attP40/CyO</i>	GFP membranaire
Bloomington	#29954	<i>LexAop-nls::GFP</i>	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lexAop-2xhrGFP.nls}2a</i>	GFP nucléaire
Bloomington	#52272	<i>LexAop::mcherry</i>	<i>y[1] w[*]; PBac{y[+mDint2] w[+mC]=13XLexAop2-6XmCherry-HA}VK00018/CyO, P{Wee-P.ph0}Bacc[Wee-P20]; Dr[1]/TM6C, Sb[1] Tb[1]</i>	RFP membranaire
Bloomington	#29956	<i>LexAop-nls::mcherry</i>	<i>w[1118]; P{w[+mC]=lexAop-2xmRFP.nls}2</i>	RFP nucléaire
Bloomington	#44274	<i>LexAop-GCaMP6s</i>	<i>w[1118]; P{y[+t7.7] w[+mC]=13XLexAop2-IVS-GCaMP6s-p10}su(Hw)attP1</i>	Senseur calcique GCaMP6s

2. Analyses transcriptionnelles

A. Extraction d'ARNs totaux et digestion DNase I

Les extractions d'ARNs sont faites à partir de 3 à 6 tubes de 20 individus âgés de 3 jours. Les têtes sont séparées manuellement des corps, et introduites dans des Eppendorf contenant 500µL de TRIzol™ LS (Invitrogen™, #10296028). Le TRIzol™ est une solution commerciale de phénol et de guanidine isothiocyanate (agent chaotropique) permettant la dénaturation des protéines (incluant les RNAses et DNAses), tout en isolant et gardant l'intégrité des acides nucléiques. Grâce à une bille de tungstène (QIAGEN) placée dans chaque tube et un TissueLyser (QIAGEN), qui agite les tubes à une fréquence de 30Hz, pendant 30 secondes (x3 répétitions), les têtes de drosophiles sont broyées et lysées. Ensuite, 100 µL de chloroforme (trichlorométhane, Sigma) sont ajoutés aux échantillons, puis mélangés par inversion des tubes, et laissés incuber pendant 5 minutes. Les acides nucléiques vont venir se solubiliser au chloroforme et quitter la partie TRIzol™. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000rpm pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer les phases. La phase chloroforme contenant les acides nucléiques est récupérée, et incubée 5 minutes avec 250µL d'Isopropanol (2-propanol, Sigma), ce qui va permettre de précipiter les acides nucléiques. Après une centrifugation à 12000rpm à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé. Le culot d'acides nucléiques est ensuite lavé 2 fois à l'éthanol 70% (#02851, Sigma, Ethanol 99% reagent grade dilué), puis séchés sous hotte, et repris dans 12 µL d'H₂O RNase Free. 2µL sont utilisés pour déterminer la concentration d'acides nucléiques grâce à un spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific), à une longueur d'onde de 260nm. Une digestion à la DNase I (1U/µL, Thermo scientific, #EN0521) est réalisée pour éliminer une éventuelle contamination ADN des échantillons. Le volume correspondant à 2µg d'acides nucléiques est placée dans un volume réactionnel de 20µL. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (SimpliAmp™ Thermal Cycler, de Thermo Fischer Scientific, #A24812), qui suit le cycle suivant : 30 minutes à 37°C pour activation de la DNase I, puis 5 minutes à 4°C, période pendant laquelle sont ajoutés 2µL d'EDTA (0,5M) pour chélater les ions indispensables au fonctionnement de la DNase, et ainsi l'inactiver chimiquement, puis 10 minutes à 65°C pour inhiber thermiquement la DNase, et pour finir les échantillons sont placés à 4°C.

B. Rétrotranscription (RT)

Le Kit iScript de BioRad (#170-8891) a été utilisé pour générer des ADNc à partir des ARNs extraits. La réaction de rétrotranscription est réalisée dans un volume réactionnel de 20 μ L, avec 1 μ g d'ARN totaux, 1 μ L de Reverse transcriptase et 4 μ L de tampon (contenant le tampon de l'enzyme et un mélange d'amorces hexamérique et d'oligo dT), ajuster avec de l'eau ultrapure. A l'aide du thermocycleur, le mélange est incubé 5 minutes à 25°C, permettant l'hybridation des amorces aux ARNs, suivi de 30 minutes à 42°C permettant la synthèse des ADNc par la iScript, et terminé par 5 minutes à 85°C afin d'inactiver thermiquement l'enzyme. Les ADNc sont conservés à 4°C.

C. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette méthode permet d'amplifier fidèlement des fragments ADN d'intérêt. Afin d'analyser l'expression des différents transcrits de *mnd* dans différentes parties du corps de la drosophile adulte, des couples d'amorces ont été définies ciblant spécifiquement chacun des transcrits. Les amorces doivent être composées de 20 bases environ, avec un taux de GC de plus de 50%, et une température d'hybridation proche de 60°C. La spécificité des amorces est vérifiée par BLAST sur le génome de référence du NCBI, en s'assurant que seul le gène cible est reconnu (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), ou que les gènes non cibles qui sont potentiellement amplifiés peuvent être discriminés par leur taille d'amplicons.

Les PCRs sont faites dans un volume réactionnel final de 50 μ l, à partir de 2 μ l d'ADNc, en accord avec les instructions d'utilisation de l'ADN Polymerase PhusionTM High-Fidelity de chez Thermofisher (#F530S). Pour chaque réaction de PCR, le mix suivant a été préparé :

- Le tampon HF 5X, supplémenté en MgCl²⁺ à 7,5mM, indispensable au bon fonctionnement de la polymérase, à une concentration finale de 1X (1,5mM MgCl₂⁺).
- chaque dNTPs à 200 μ M final provenant de Thermo scientific (#R0181),
- chaque amorce à 0,5 μ M final (toutes provenant de Eurogentec),
- 2 μ l d'ADN
- 0,02U/ μ l final de PHusion polymerase.

Le programme PCR suivi est le suivant : 30 secondes à 98°C (dénaturation initiale); puis 35 cycles de 10 secondes à 98°C (dénaturation), 60 secondes à 60°C (hybridation), 30 secondes à 72°C (extension) ; puis une étape de 10 minutes à 72°C d'extension finale.

La taille des produits de PCRs a été analysée par migration électrophorétique sur gels d'agarose 3% (100mL TAE 1X (#A4686, PanReacAppliChem) + 3g d'agarose (#LE-8200-B, Euromedex)) complété en BET (Bromure d'éthydiure, #E-1510, Sigma), qui est un intercalant de l'ADN visible à la lumière UV, permettant de révéler les fragments d'ADN. Un tampon de charge est utilisé avec les échantillons afin de faciliter le dépôt sur gel (#10-0111, Euromedex). Les gels sont imagés sous trans illumination UV par un Chemidoc (Bio-rad). La taille des fragments a été déterminé grâce au logiciel ImageLab (version 6.1) en utilisant un marqueur de taille allant de 100pb à 1kb (#03B-0713, Euromedex), ou de 250pb à 10kb (#03B-1214, Euromedex). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau VI.

Tableau VI : Liste des amorces utilisées en RT PCR.

N°PCR	Cible	Nom amorce	Séquence amorce 5'->3'	Température de fusion théorique (Tm)	Taux de GC (%)	Taille de l'amplicon
PCR1	<i>mnd-commun</i>	<i>mnd-commun</i> Forward	GGACAATCCCTCATCGTTTG	56,5°C	50	95pb
		<i>mnd-commun</i> Reverse	CCTGATTGGGTATCATCGTG	56,48°C	47,62	
PCR2	<i>mnd-RA</i>	<i>mnd-RA</i> Forward	GTGCGTCCATCCGATATTC	56,77°C	50	111pb
		<i>mnd-RA</i> Reverse	TCCACGTGGTTCTATCATGTTC	58,14°C	45,45	
PCR3	<i>mnd-RC</i>	<i>mnd-RC</i> Forward	TGGGTAACGGTTCTCCCTCT	59,88°C	55	183pb
		<i>mnd-RC</i> Reverse	AGCGTGGAGCTTCCAATACA	59,39°C	50	
PCR4	<i>mnd-RD</i>	<i>mnd-RD</i> Forward	TTCTCCCTCTATCGGAACCA	57,16°C	50	114pb
		<i>mnd-RD</i> Reverse	GGAGGAACCTCGAACACCT	58,64°C	57,89	
PCR5		<i>mnd-RC</i> Forward	TGGGTAACGGTTCTCCCTCT	59,88°C	55	

	<i>mnd</i> -RC, <i>mnd</i> -RD	<i>mnd</i> -commun2 Reverse	TTTCGGTACGGATCCTTGAG	57,05	50	856pb (RD) et 1186pb (RC)
PCR6	vérifier que RA n'a pas l'exon 1	<i>mnd</i> -RC Forward	TGGGTAACGGTTCTCCCTCT	59,88°C	55	0
		<i>mnd</i> -RA Reverse	TCCACGTGGTTCTATCATGTTC	58,14°C	45,45	

D. PCR quantitative (qPCR)

Cette méthode permet de quantifier de façon relative le taux d'expression de gènes cibles, par rapport à un gène de référence, grâce à la détection d'un intercalant de l'ADN fluorescent tel que le SYBRGreen. A chaque réaction de polymérisation, la quantité d'ADN double de manière exponentielle et est mesurée à chaque cycle grâce à la fluorescence du SYBRGreen, qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ainsi, la quantité de matrice initiale présente dans l'échantillon amplifié est évalué en déterminant le cycle seuil à partir duquel la fluorescence est détectée. Pour chaque échantillon, le gène de référence *Rp49*, codant une sous-unité ribosomique, connu pour être exprimé de manière ubiquitaire et constante, est utilisé pour réaliser une quantification relative de l'expression du gène d'intérêt. La méthode de calcul $\Delta\Delta Ct$ est utilisée pour calculer ces quantités relatives d'ADNc. Pour chaque génotype testé, l'abondance relative de transcrits de gène cible est normalisée par rapport au gène de référence (*Rp49*) et de façon relative à des individus témoins. Ainsi, la quantité de transcrit du gène cible peut être calculée et est égale à $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condition testée}} - \Delta Ct_{\text{condition témoin}}$ et $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{Rp49}$.

Pour chaque réaction : 10 μ L d'iQ SYBR Green Supermix (contenant l'iTaq DNA polymerase, le tampon de l'enzyme, des dNTPs, du MgCl₂ et du SYBR Green I ; kit Fast SYBR Green (#4385612 et #4385614, Thermo scientific), 1 μ L d'un mélange d'un couple d'amorces adéquates à 10 μ M, 1 μ L d'ADNc de l'échantillon et 8 μ L d'H₂O ultrapure sont mélangés dans un puits d'une plaque 96puits (#4346907, Life technologies). Chaque réaction est réalisée en trois répliquas techniques sur les trois échantillons indépendants. La plaque est ensuite placée dans un thermocycleur iCycler MyiQ™ de Biorad, où 40 cycles du programme sont faits. Le programme PCR suivi est le suivant : 20 secondes à 95°C (dénaturation initiale); puis 40 cycles d'amplification de 3 secondes à 95°C suivi de 30 secondes à 60°C. La détection de la fluorescence se fait à chaque fin

de cycle. Puis, les cycles pour déterminer les courbes de fusion sont faits : 15 secondes à 95°C puis 1 heure à 60°C. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau VII.

Tableau VII : Liste des amorces utilisées en RT qPCR.

Cible	Séquence 5'→3'	Température de fusion théorique (T _m)	Taux de GC (%)	Taille de l'amplicon	Transcrits ciblés/transcrits
<i>Rp49</i> Forward	AGGCCCAAGATCGTGAAGAA	59,02°C	50	101pb	4/4
<i>Rp49</i> Reverse	TCGATACCCTTGGGCTTGC	59,78°C	57,89		
<i>mnd</i> Forward	GGACAATCCCTCATCGTTTG	56,5°C	50	95pb	3/3
<i>mnd</i> Reverse	CCTGATTTGGGTATCATCGTG	56,48°C	47,62		
<i>NmdaR1</i> Forward	AGGAAGGAAAAGCGGAAAAG	56,23°C	45	158pb	1/1
<i>NmdaR1</i> Reverse	GGGGAGGATAAACGAGGTGT	58,8°C	55		

3. Immunohistochimie sur cerveaux *in toto*

A. Dissection et immunomarquages

Les drosophiles sont anesthésiées par du CO₂ et plongées pendant quelques minutes dans un bain d'éthanol 70% afin d'éliminer les hydrocarbures cuticulaires, puis placées dans une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (Euromedex, #EU1-8912-100). Les cerveaux sont ensuite disséqués sous loupe binoculaire, grâce à des pinces de dissections ultra fines (Pincés Dumont modèle Suisse N°5F, Moria ; ou Dumont) dans du PBS 1X. Une fois disséqués, les cerveaux sont fixés durant 30 à 45 minutes dans une solution de PFA 4% (Electron Microscopy Sciences, #15710) dilué dans le PBS 1X, puis lavés 6x10 minutes avec une solution de PBS-Triton 0,3 %. Un dernier bain de 10 minutes est réalisé dans du PBS-Triton 1% afin de bien perméabiliser les membranes biologiques, et de permettre une bonne pénétration des anticorps. Les cerveaux sont ensuite incubés 1h dans une solution de blocage (solution PBS1X+ 10% de Normal Goat Serum (NGS) (Sigma #G9023)) à température ambiante (TA), permettant de bloquer les sites aspécifiques. Les cerveaux sont ensuite placés dans une solution contenant l'anticorps primaire adéquat, à une concentration donnée (tableau VII), dilué dans une solution de NGS 5% PBS-Triton 0,3%, sur une durée de 36 à 48

heures, à 4°C. Les cerveaux sont ensuite lavés 6x10 min avec une solution de PBS-Triton 0,3%, puis incubés pendant 3 h à TA dans un bain d'anticorps secondaires donnés à une concentration déterminée (tableau VIII), dilués dans une solution de NGS 5% PBS-Triton 0,3 %. Après 6X10 min de rinçage avec une solution de PBS 1X, les cerveaux sont ensuite montés entre lame (Starfrost® polycaté, Knittel glass) et lamelle (24-50 mm no.1, Knittel Glass) dans du Vectashield® Mounting Medium avec dapi (#H1100) ou sans dapi (#H1000-10) en fonction des expériences. Les lames sont lutées avec du vernis à ongle transparent, et gardées à 4°C avant d'être imagées au microscope confocal.

Tableau VIII : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistologie.

Anticorps Primaires	Type/Espèce	Dilution	Provenance
Anti-MND	Polyclonal/Lapin	1/250	Open Biosystem
Anti-GFP	Monoclonal IgGa/Souris	1/200	Invitrogen (A-11120)

Tableau IX : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunohistologie.

Anticorps Secondaires	Type/Espèce	Dilution	Provenance
Anti IgG (H+L) de souris couplé à l'Alexa 488	Polyclonal/Chèvre	1/400	Invitrogen (A-6455)
Anti IgG (H+L) de lapin couplé à l'Alexa 594	Polyclonal/Chèvre	1/400	Invitrogen (A-11037)
Anti IgG (H+L) de lapin couplé à l'Alexa 647	Polyclonal/Chèvre	1/400	Invitrogen (A-32733)

B. Acquisition par microscopie confocale

Les lames de cerveaux obtenues précédemment sont imagées grâce à un microscope confocal inversé à fluorescence à balayage laser DMi8 (Leica, modèle TC-SP8). La source de lumière est une lampe à halogénures de type EL6000. La visualisation des différents fluorochromes se fait en illuminant les échantillons séquentiellement avec les différentes diodes lasers : DL 405nm (50mW), DL 488nm (20mW), DL 552nm (20mW) et DL 638nm (30mW). Les bornes de détection des capteurs (hybrides ou PMT) sont placées en fonction des fluorochromes présents dans l'échantillon. Des pas de 1µm en Z sont effectués afin d'imager toute l'épaisseur des

échantillons. Le logiciel LAS X est utilisé pour les acquisitions d'images, et pour la reconstruction des acquisitions en mosaïque.

C. Traitement des images

Le logiciel LASX est utilisé pour aligner les différents quadrants d'acquisition en mosaïque, et reconstruire l'image. Le traitement des différents canaux d'émission sont traités grâce au logiciel Fiji (version 2.14.0/1.54f).

4. Analyses bio-informatiques d'expression génétique

Grâce aux études du transcriptome sur cellule unique, des bases de données ont été établies permettant la création d'atlas d'expression génétique tissu ou organe spécifique. Afin d'évaluer la possibilité d'une expression commune de deux gènes d'intérêt au sein de cellules du cerveau, la banque de données public provenant de l'article Davie *et al.*, 2018 a été utilisée, disponible dans l'outil Scope (<https://scope.aertslab.org/#/FlyCellAtlas/>).

5. Imagerie calcique fonctionnelle sur cerveau adulte *ex vivo*

L'activité neuronale dépend d'échanges ioniques qui permettent de dépolariser (activation) ou d'hyperpolariser (inhibition) la membrane plasmique des neurones. En général, les ions Ca^{2+} sont impliqués dans ces mécanismes. C'est pourquoi la variation de concentration intracellulaire de Ca^{2+} est un bon marqueur de l'activité neuronale.

Chez la drosophile, un rapporteur/senseur du calcium, la GCaMP, permet de visualiser *in vivo* l'augmentation ou la diminution de l'activité neuronale. La GCaMP est une GFP modifiée couplée à une calmoduline. Lorsque la calmoduline fixe quatre ions Ca^{2+} , un changement conformationnel de la GFP s'effectue, provoquant la déprotonation de son chromophore, ce qui permet l'émission de fluorescence observable à 550 nm après excitation à 475 nm (Nakai *et al.*, 2001). L'augmentation de fluorescence est proportionnelle à la présence d'ions Ca^{2+} et peut alors être quantifiée pour analyser l'activité neuronale. Nous utilisons la GCaMP6s développée par Chen et collaborateurs (2013). Cette nouvelle génération de GCaMP possède les caractéristiques les plus optimales et performantes : réponse rapide, plus sensible aux

ions Ca^{2+} , et un meilleur rapport signal/bruit.

A. Protocole d'acquisition de l'activité des neurones

En pratique, afin d'étudier la réponse des neurones des CPs aux AAs et au NMDA, le cerveau des adultes (3 jours) est disséqué rapidement à TA dans une solution de Ringer (182 mM KCl ; 46 mM NaCl ; 3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM Tris-HCl ; pH 7,2). Il est ensuite placé dans 150 μL de Ringer déposés sur une platine en silicone. Le cerveau est épinglé avec des minuties au niveau des lobes optiques, face postérieure vers la platine, pour éviter tout mouvement durant l'acquisition. Le dispositif est ensuite placé sous un microscope droit à épifluorescence Leica DM6000B, équipé d'un objectif x25 à immersion à H_2O . La mise au point est rapidement faite sur les lobes de CPs, et l'acquisition commence à raison de 2 images/seconde. Après 50 secondes d'acquisition (100 images), 150 μL de la solution de Ringer contenant la molécule à tester (Solution Mère) sont rajoutés. La concentration de la Solution Mère en AAs ou NMDA est doublement concentrée en raison d'une dilution d'un facteur 2 pour obtenir la concentration finale testée. L'acquisition continue durant environ 350 secondes afin d'enregistrer les variations de fluorescence induite par la solution à tester. Les étapes de la manipulation sont schématisées dans la Fig.M7. Tous les acides aminés testés sont de type lévogyre (L-) et proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich, tout comme le NMDA (#M3262). Afin de s'assurer que les neurones ne soient pas morts durant l'acquisition, du KCl est appliqué après environ 400 secondes afin de stimuler les neurones des CPs.

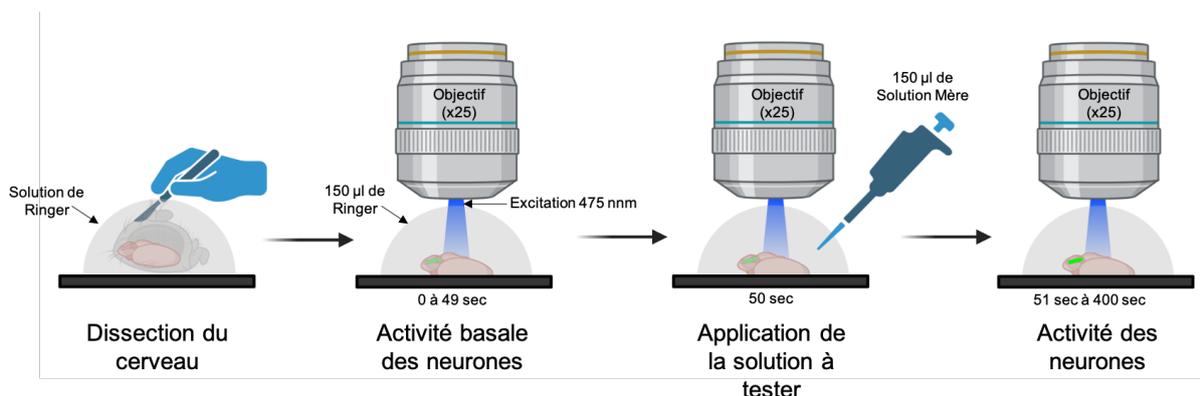


Fig. M5 : Schéma représentant les différentes étapes d'une manipulation d'imagerie calcique fonctionnelle *ex vivo*.

Dissection du cerveau rapidement à TA dans une solution de Ringer. Fixation du cerveau dans 150 μL de Ringer sur la platine, sous un objectif x25. Acquisition de l'activité basale des lobes des CPs avec un laser 475 nm, durant

49 secondes. Application de 150 μ L de la Solution Mère à tester. Acquisition de l'activité des lobes des CPs durant 349 secondes. Schéma créé grâce à BioRender.

B. Traitement des données d'imagerie calcique

Les enregistrements obtenus sont analysés grâce au logiciel Fiji. Des régions d'intérêts (ROI lobes) sont définies en englobant chaque lobe α/β (deux ROIs par cerveau). Cette région a été choisie pour sa simplicité et répétabilité d'observation sur tous les cerveaux. Si les cellules de Kenyon avaient été choisies comme ROI, il aurait été compliqué d'avoir toujours le même nombre de neurones d'un individu à l'autre mais aussi d'avoir tous les neurones observables dans un même plan, ce qui pourrait conduire à une mauvaise interprétation des résultats. Un autre ROI est défini en dehors des lobes des CPs en évitant de prendre une région trop proche des CPs ou KCs pour tenir compte des variations de bruit de fond de fluorescence de l'échantillon en cours d'enregistrement. Ce ROI sera soustrait sur chaque image aux valeurs d'intérêts (ROI lobes). Une intensité de GFP peut donc être mesurée au niveau des lobes tout au long de l'enregistrement.

Pour normaliser les mesures, un ratio est alors calculé $\Delta F/F_0 = (F-F_0)/F_0$. F_0 est calculé en réalisant la moyenne des 5 valeurs avant l'introduction de la molécule à tester (images 95 à 100). Cette valeur F_0 est soustraite à chaque valeur d'intensité de fluorescence (totalité de l'enregistrement). Une représentation graphique est réalisée de ces valeurs pour voir l'évolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps et permettre de déterminer le pic d'intensité. Une moyenne des 5 valeurs autour du pic est alors calculée et nommée F. Ainsi, $(F-F_0)/F_0$ est calculé pour chaque lobe de chaque cerveau. Si cette valeur est positive, l'intensité de fluorescence est augmentée par rapport à l'intensité de fluorescence basale et donc la molécule testée induit une activation des neurones des CPs. Si la valeur est négative, alors l'intensité de fluorescence après administration de la molécule testée est en dessous de l'intensité de fluorescence basale, ce qui montre une inhibition de la molécule testée sur l'activité neurones des CPs.

6. Tests de comportements sociaux chez *Drosophila melanogaster*

A. Préparation des individus

Les lignées de drosophiles utilisées en comportement ont été retro-croisées sur cinq générations avec la lignée *Canton S* afin d'homogénéiser leur fond génétique pour minimiser l'effet du fond génétique. Afin d'obtenir des individus hétérozygotes pour nos transgènes, des croisements entre mâles de lignée *Gal4*, *UAS* ou *Gal4>UAS* d'intérêt sont effectués avec des femelles *Canton S* (4 mâles x 12 femelles). Le même nombre d'individus est croisé pour toutes les lignées afin de garder la même densité d'individu dans chaque tube et éviter les effets spécifiques de la taille ou la densité du groupe sur le comportement des individus, notamment la ponte d'œufs (Rooke *et al.*, 2020 ; Bailly *et al.*, 2023). De même, la densité de larves générée par ces croisements sera du même ordre de grandeur, minimisant l'effet de la densité de larves sur le comportement adulte, notamment de recherche de nourriture (Slepian *et al.*, 2015).

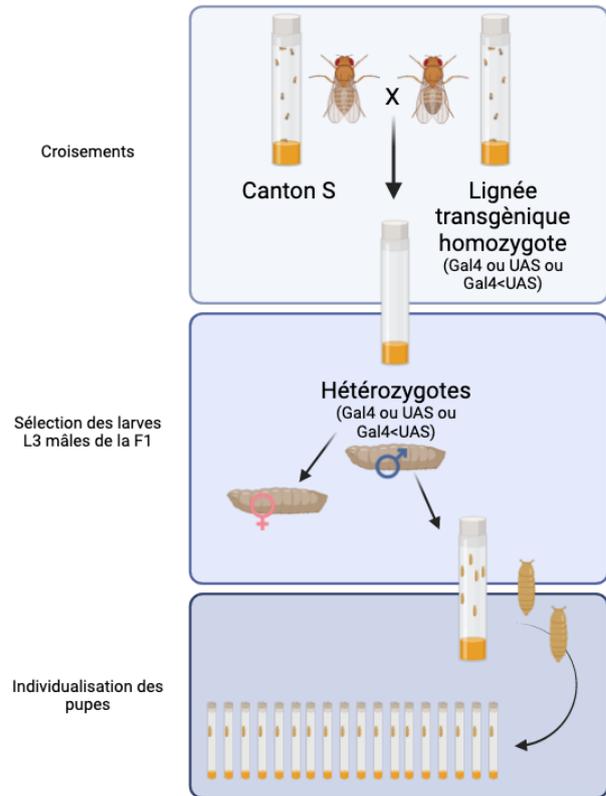


Fig. M6 : Représentation schématique de la génération des individus utilisés pour les tests de comportement.

Croisements des lignées d'intérêts, sélections des larves L3 mâles, individualisation des pupes.

Les croisements sont repiqués à la même heure pendant 3 à 4 jours afin d'avoir un minimum de synchronicité dans les émergences des imagos. 6 jours après les croisements, les larves L3 sont triées par sexe avec des pinces fines dans de l'eau distillée. Les larves mâles sont regroupées par groupe de 20 individus dans des tubes en plastique contenant de la nourriture standard. Les larves ne sont pas triées à des stades plus précoces pour ne pas modifier la prise alimentaire, cruciale pour atteindre la masse critique nécessaire à la pupaison (Mirth *et al.*, 2005).

Après 3 à 4 jours, les larves se nymphosent et sont individualisées dans des tubes en verre de 14mm de diamètre et de 100mm de long, fermés par du coton naturel cardé décontaminé (Raffin, #030402). Les mâles sont donc strictement isolés socialement des autres mâles pour les tests de comportement en condition « isolé » (Fig.M8). Par contre, pour les tests de comportement en condition « groupés », les pupes sont rassemblées par 6 dans un tube en verre afin d'avoir 6 mâles qui interagissent les uns avec les autres.

B. Test de comportement d'agressivité

Le protocole de test de comportement d'agressivité a été défini par Trannoy et collaborateurs (2015b) permettant de tester l'agressivité territoriale des mâles. Il a pour avantage d'éliminer toute intervention « manuelle » pouvant modifier le comportement. Il évite l'anesthésie par le CO₂ ou le froid pour introduire les drosophiles dans les arènes de test. Depuis que Muria et collaborateurs (2021) ont mis en évidence un effet du CO₂ sur la cognition des drosophiles, notamment la mémoire à long terme (LTM), il est préférable d'éviter le CO₂ car nous ne pouvons pas exclure un potentiel effet du CO₂ qui pourrait impacter le comportement d'agressivité. De même, l'aspiration et l'anesthésie au froid modifient le comportement d'agressivité (Trannoy *et al.*, 2015a). Ainsi, le protocole utilisé ici met à profit le réflexe de géotaxie négative qui permet aux drosophiles de rentrer dans les arènes de test sans aucune manipulation humaine. 24 heures avant le test, tous les individus à tester sont observés et vérifiés avec une loupe binoculaire au travers du tube en verre : vérification du sexe, intégrité physique potentiellement impactée par les différentes manipulations au stade larvaire et locomotion.

Le comportement d'agressivité des mâles chez *Drosophila melanogaster* est basé sur la territorialité des mâles par rapport à une source de nourriture (levure). Les arènes de comportement sont faites à partir d'acrylique, matière synthétique obtenue à partir d'huile minérale ou d'hydrocarbures (Fig.M9). Au centre de cette arène se trouve un bouchon rempli de nourriture standard, surmontée d'une goutte de levure (*Saccharomyces cerevisiae*, (Briochin, Alsa) à une concentration d'environ 0,450g/mL (activées dans de l'eau distillée). Un séparateur central amovible en inox permet de séparer l'arène en deux hémicycles. Les mâles sont introduits séparément dans chaque hémicycle par les ouvertures latérales qui sont ensuite obstruées par du coton afin

d'éviter aux mâles de s'échapper. Les deux mâles ne peuvent pas se voir grâce au séparateur, ce qui leur permet de s'acclimater à l'arène pendant 10 minutes sans aucune interaction entre eux. Le séparateur central est ensuite enlevé pour que les mâles puissent interagir, puis l'enregistrement vidéo commence pour une durée de 20 min. Les films sont enregistrés à 50 images/seconde par des caméras SONY HDR-CX625 ou des caméras a2A1920-160uc (BASLER) avec des objectifs 50mm à ouverture 1:2.6 (BASER), pilotées grâce au logiciel StreamPix9, développé par NordPix. Les tests sont faits entre ZT0 et ZT2 (Zeitgeber Time), période où les drosophiles sont les plus actives, dans une pièce dont la température est contrôlée et constante aux alentours de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Les arènes sont éclairées avec des lampes à lumière blanche chaude, 250 lumens, 2700K, 2.2W (Philips) Après les tests, les arènes de comportement sont démontées, chaque pièce est rincée et frottée individuellement à l'eau du robinet. Elles sont ensuite trempées dans un bain de RBS® AM 35 MD (Sigma-Aldrich) à 2%, dans des bacs fermés par des couvercles, pendant 2 à 4h. Chaque pièce est minutieusement frottée puis rincée deux fois à l'eau distillée. Les pièces sont laissées à sécher sous un couvercle afin d'éviter que des odeurs ne se fixent dessus, dans la salle de comportement.

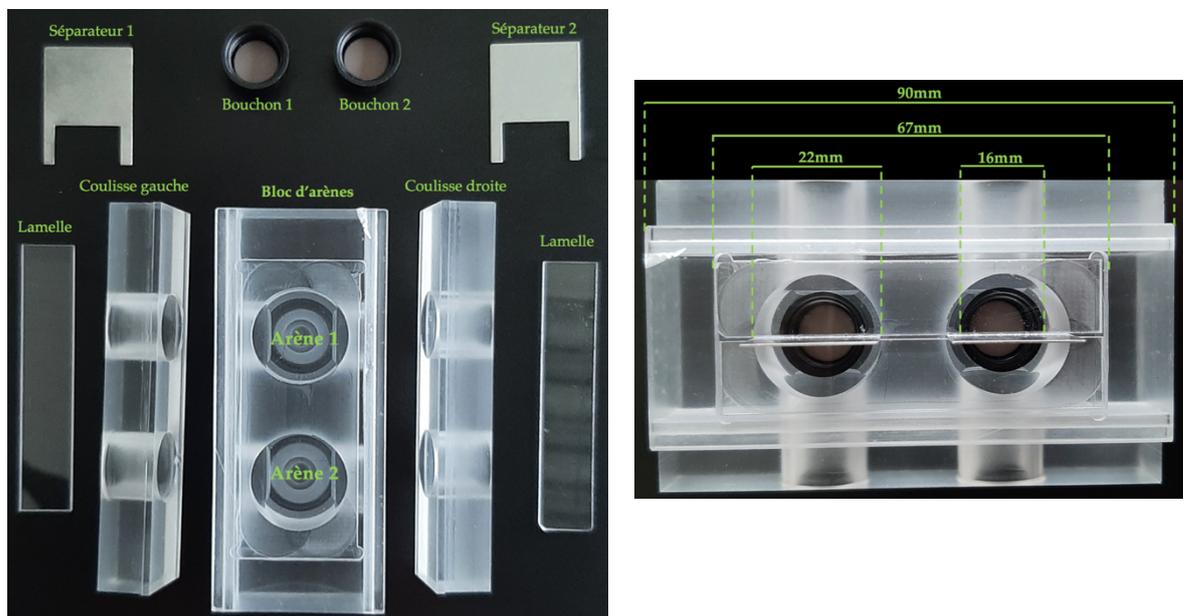


Fig. M7 : Photos du dispositif d'arènes utilisé pour le comportement d'agressivité. La photo de gauche montre les différentes parties d'un bloc d'arène, avec le bloc central disposant de deux arènes, les coulisses, les bouchons qui seront remplis de nourriture surmontée de levure et placés dans les arènes lors des tests. Les lamelles transparentes afin de fermer le haut des arènes et les séparateurs opaques afin de diviser l'arène en deux hémicycles. La photo de droite montre un dispositif assemblé.

C. Traitement des données

L'annotation des vidéos est faite manuellement à l'aide de logiciel libre d'accès Vcode (v.2.3.1) ou BORIS (v.7.13.8). Les différents comportements stéréotypés de l'agressivité sont comptabilisés :

- les coups violents ou lunges sur le patch de nourriture. Définis par l'attaque physique d'un individu sur l'autre en levant ses pattes prothoraciques et frappant rapidement l'adversaire.
- les menaces visuelles d'ailes ou threats, définies par le placement des ailes à 45° par rapport au corps de l'individu, et maintenues pendant au moins 1 seconde face à l'adversaire.

D'autres paramètres ont été analysés :

- L'Indice de Vigueur d'Agressivité (IVA) (Trannoy *et al.*, 2015a) qui correspond au nombre de lunges comptabilisés pendant 10 min suivant le premier lunge identifié.
- La latence, le temps que met les individus à initier le premier lunge.
- D'autres éléments comportementaux sont quantifiés comme le comportement de parade sexuelle : les chants alaires sur le patch de nourriture (wings).

Ces éléments vont permettre d'évaluer le niveau d'agressivité des individus.

D. Test du comportement d'espacement social

Pour tester l'implication potentielle de gènes d'intérêt dans le comportement des mouches au sein d'un groupe, il est possible d'analyser le comportement d'espacement social (Simon *et al.*, 2012). C'est-à-dire la façon dont les individus se placent les uns par rapport aux autres dans un espace clos. Ce comportement est dépendant de la détection des signaux spécifiques des congénères et les circuits neuronaux associés, tel que les CPs (Sun *et al.*, 2020). Afin de déterminer si des protéines d'intérêts participent ou non à la régulation de l'espacement social, des tests de « social spacing » ont été faits, se basant sur le protocole de McNeil et collaborateurs (2015).

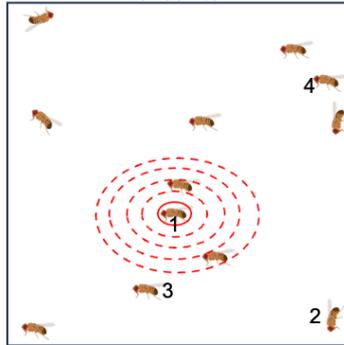
Les individus sont préparés et isolés comme décrit précédemment. Le jour du test, 12 individus mâles isolés, âgés de 3 jours, et du même génotype sont rapidement

anesthésiés sur de la glace pendant 1 minute, afin d'être disposés dans une enceinte de comportement. 12 individus sont ainsi introduits dans une enceinte. L'enceinte est délimitée par deux plaques transparentes de plexiglas enserrant un cadrant central de 72mm x 72mm x 4mm permettant aux individus de se mouvoir et d'explorer librement, sans s'échapper. L'enceinte est déposée horizontalement ce qui permettra l'analyse de l'espacement social en évitant de prendre en compte de potentiel problème de « climbing » (McNeil *et al.*, 2015), qui peut moduler l'espacement social si l'enceinte est mise verticalement. Après 10 minutes d'habituation dans le dispositif, l'enceinte est tapotée verticalement sur la paillasse afin que toutes les drosophiles se retrouvent au même niveau, en bas de l'enceinte. Lorsque les individus ne bougent plus les uns par rapport aux autres et forment un groupe stable, une photo de l'enceinte est prise (entre 20 à 30 minutes).

Différentes méthodes d'évaluation de l'espace social sont utilisées, et j'ai choisi de m'appuyer sur la méthode de Yost *et al.*, 2020 et Xie *et al.*, 2018. Pour étudier l'espacement social, on peut quantifier le nombre de mouches présentes à une distance de quatre longueurs de corps autour de chaque mouche. Plus ce nombre est grand plus les mouches sont agrégées. Pour acquérir cette information, les images ont été traitées à l'aide du logiciel Fiji. Premièrement, la longueur de chaque individu présent dans l'arène est mesurée, et une moyenne est faite. Cette valeur représente la longueur moyenne d'un corps de drosophile, qui va nous servir de référence. Le logiciel Fiji permet de détecter chaque individu sur l'image et de mesurer la distance séparant chaque individu dans l'arène grâce au plugin « Bubble » (Yost *et al.*, 2020) (Fig. M10). Une vérification manuelle est faite pour s'assurer que chaque individu est correctement « détourné » par le logiciel. Puis, le logiciel détermine combien d'individus sont dans un rayon de 4x la longueur moyenne d'un corps d'un autre individu, paramètre déterminant de la distanciation sociale chez la drosophile. Ce nombre d'individus est relevé pour chaque mouche d'une enceinte, moyenné et comparé aux autres tests, afin de savoir si une dérégulation d'un gène d'intérêt a un effet sur la répartition des drosophiles entre elles dans l'enceinte.

A Exemple schématique

12 mâles *Canton S* dans une
enceinte



L'individu 1 analysé a deux voisins
dans un rayon de quatre longueurs
de corps

B Exemple de quantification du nombre
de voisins et calcul de # voisins

Individu 1 : 2 voisins
Individu 2 : 0 voisin
Individu 3 : 1 voisin
Individu 4 : 2 voisins
Individu 5 : 1 voisin
.....

En moyenne, ces 12
individus ont 0,9 voisin.

voisins = 0,9

Fig. M8 : Schéma explicatif de la détermination de l'indice « # voisins » dans le test de « social spacing ».

A) Exemple schématique d'une enceinte contenant 12 mâles. La longueur des corps des individus est déterminée, moyennée et multiplié par 4. Cette valeur est le rayon du cercle dans lequel nous considérons qu'une mouche est voisine. Au-delà, les individus ne sont pas considérés comme des voisins. Le plugin « bubble » va automatiquement comptabiliser le nombre de voisin pour chacun des 12 individus. La moyenne de ces valeurs est l'indice noté « # voisins ».

Chapitre 3

Résultats

Partie 1

mind est exprimé dans les neurones et les cellules gliales du cerveau adulte.

Dans les neurones α/β des corps pédonculés, MND est requis pour la réponse à différents acides aminés, dont la leucine qui met en jeu une voie TOR dépendante.

Dans les corps pédonculés, MND ne semble pas être un acteur majeur dans la modulation du comportement d'agressivité territoriale entre mâles.

Afin d'étudier la fonction de MND dans le SNC adulte, il apparaît stratégique, dans un premier temps, de déterminer le profil d'expression de ce gène et la localisation cellulaire de la protéine MND.

1. Profil d'expression de *mnd* et localisation de MND dans le cerveau adulte

D'après les bases de données Flybase et ensembl, il existerait 3 transcrits de *mnd* liés à un épissage alternatif en région 5'UTR, nommé *mnd-RA*, *mnd-RC*, et *mnd-RD* (Fig.R1). L'analyse des différents cadres de lecture possibles pour chacun des transcrits montre la présence d'une séquence de Kozak indiquant un codon Start partagé entre ces 3 transcrits, suggérant que le produit de leur traduction est une unique protéine. (Fig.R1). De plus, la base de données Uniprot prédit une unique protéine de 499 acides aminés de longueur.

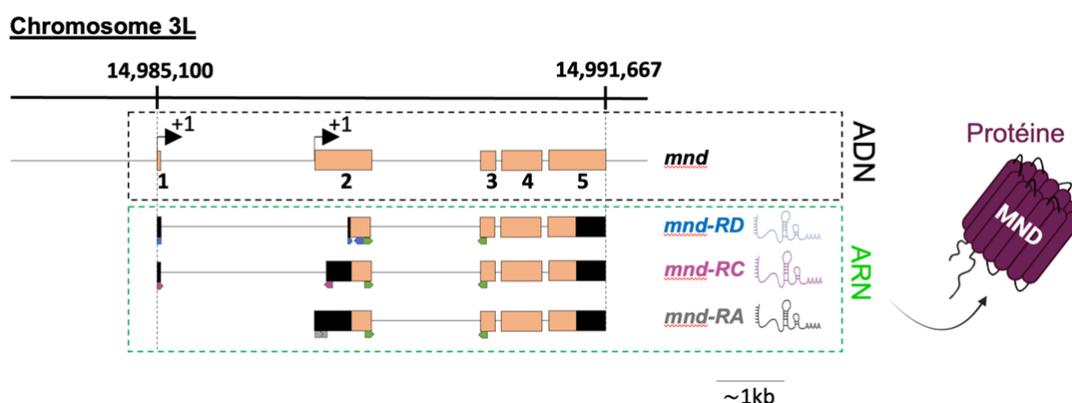


Fig. R1 : Schéma du locus *mnd* avec ses 3 transcrits et son unique protéine.

Le gène *mnd* est représenté en noir (14,985,100-14,991,667), avec les rectangles orange représentant les exons et les traits noirs les introns. Les 3 transcrits *mnd-RC*, *mnd-RD* et *mnd-RA* sont représentés dans l'encadré vert : les rectangles noirs représentent les régions non traduites (UTR), les rectangles orange les régions traduites et les traits noirs les introns (inspiré de Flybase.org). Le produit des 3 transcrits est une protéine composée de 12 domaines transmembranaires. Les amorces utilisées en PCR sont symbolisées par les flèches de couleurs : bleu pour le transcrit *mnd-RD*, rose pour *mnd-RC*, gris pour *mnd-RA* et vert pour la partie commune à chaque transcrit.

Afin de confirmer l'existence des différents transcrits de *mnd* chez l'adulte, des extractions d'ARNs ont été effectuées sur des têtes et des corps de drosophiles *w¹¹¹⁸* âgées de 3 jours. La présence des différents transcrits a été analysé par RT PCRs avec des couples d'amorces spécifiques pour chaque transcrit de *mnd* schématisés par les flèches de couleurs (Fig.R1).

Chez les femelles, nous observons la présence des transcrits *mnd-RA* et *mnd-RC*, dans les têtes ainsi que dans les corps, contrairement au transcrit *mnd-RD* qui n'est pas

déecté (Fig.R2A). Afin de s'assurer que *mnd-RD* n'est pas présent, une pré-amplification a été faite avant une PCR spécifique de *mnd-RD*. Celle-ci ne montre toujours pas la présence de *mnd-RD*. De plus, avec la PCR5 (Cf. Tableau VI « Matériel et Méthodes ») qui aurait dû permettre d'amplifier *mnd-RC* (483pb) et *mnd-RD* (124pb), une unique bande à 483pb est observable, correspondant à *mnd-RC*. Ce qui laisse penser que le transcrit *mnd-RD* n'existe pas ou qu'il est trop faiblement exprimé pour être détecté par RT-PCR. Afin de vérifier que le transcrit *mnd-RA* ne contient pas l'exon 1, une PCR6 (Cf. Tableau VI « Matériel et Méthodes ») avec l'amorce *mnd-RC* forward (ciblant l'exon 1) et l'amorce *mnd-RA* reverse (ciblant l'exon 2) ont été faites. Ces PCRs ne révèlent aucune amplification et semblent confirmer que l'ARNm du transcrit *mnd-RA* ne contient pas l'exon 1 comme prédit (Flybase.org).

Chez les mâles, *mnd* est détecté grâce au couple d'amorces communes et *mnd-RA*, dans les corps et les têtes (Fig.R2B1). Les PCRs spécifiques de *mnd-RD*, *mnd-RC* et la PCR5 (*mnd-RC* forward/*mnd-RD* reverse) ne montrent pas d'amplifications, suggérant que seul le transcrit *mnd-RA* est exprimé chez les mâles. Pour le vérifier des pré-amplifications PCR7 (Cf. Tableau VI « Matériel et Méthodes »), ont été réalisées sur les échantillons mâles. Grâce à cette pré-amplification, nous pouvons observer une amplification qui correspond à *mnd-RC* (183pb) mais aucune pour *mnd-RD* (Fig.R2B2).

De manière étonnante les produits PCR spécifiques du transcrit *mnd-RC* montrent un deuxième amplicon de 403pb uniquement sur les échantillons femelles (têtes et corps) (Fig.R2A). Il ne semble pas que cela soit une contamination génomique, de plus les blasts avec ces amorces ne prévoient aucune amplification de fragment de cette taille. Il pourrait s'agir potentiellement d'un transcrit non prédit spécifique des femelles, mais cela reste encore à déterminer.

Ainsi, les différentes RT-PCRs confirment l'expression de *mnd* dans les têtes et les corps des mâles et des femelles adultes. Les transcrits *mnd-RA* et *mnd-RC* ont pu être mis en évidence, contrairement au transcrit *mnd-RD* qui n'a pas pu être détecté. De manière intéressante, seuls les échantillons mâles ont dû être pré-amplifiés pour détecter *mnd-RC*, laissant supposer une différence d'expression de ce transcrit *mnd-RC* entre les femelles et les mâles.

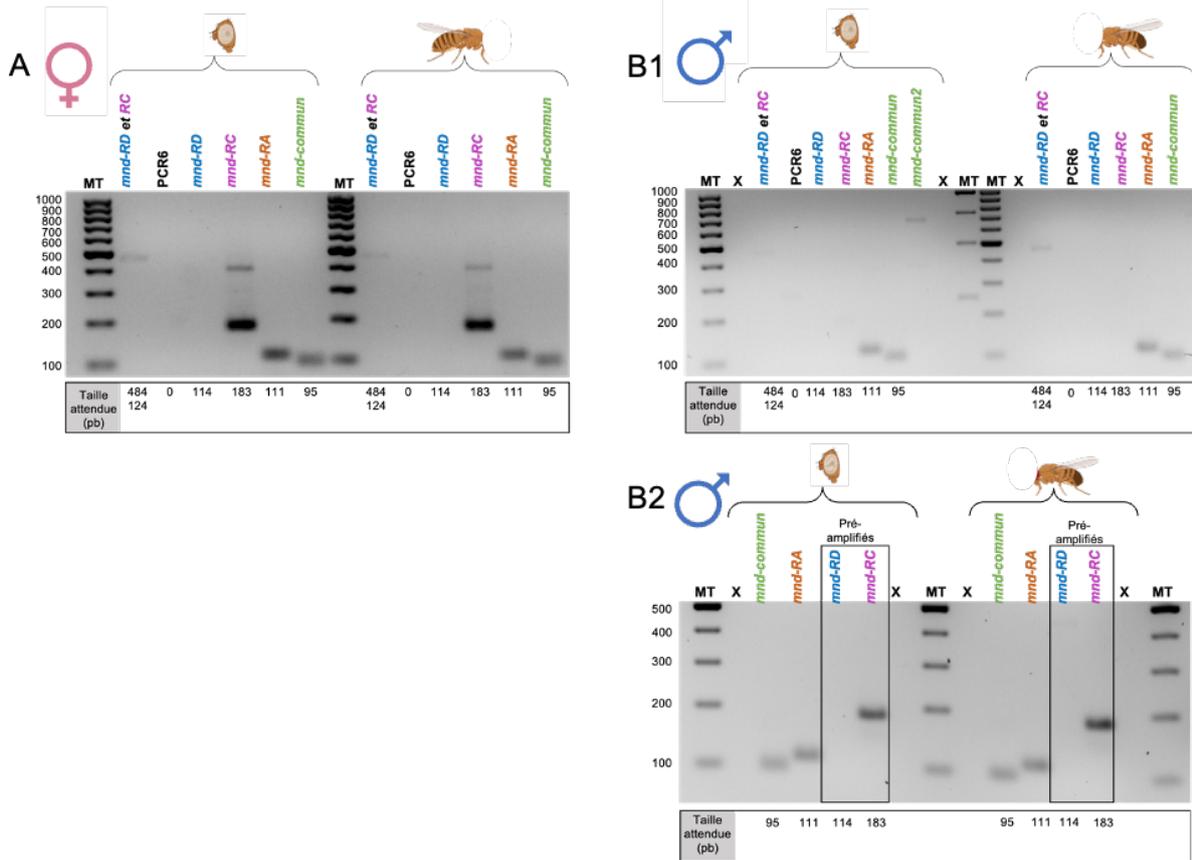


Fig. R2 : *mnd-RA* et *mnd-RC* sont exprimés dans les têtes et les corps des drosophiles.

Séparation électrophorétique (gel agarose 3%) des produits de RT-PCRs utilisant différents couples d'amorces (Fig.R1) afin de déterminer la présence des différents transcrits de *mnd*. Les extractions ARNs ont été faites sur des individus *w*¹¹¹⁸, âgés de 3 jours. Gel A : échantillons femelles têtes et corps. Gel B1 : échantillons mâles têtes et corps. Gel B2 : échantillons mâles têtes et corps, après pré-amplification pour *mnd-RC* et *mnd-RD*.

Afin d'avoir une analyse plus fine sur les potentielles différences d'expression de *mnd* entre mâles et femelles, des analyses de RT qPCRs ont été faites. Les ARNs ont été extraits de têtes de mâles ou femelles soit *w*¹¹¹⁸ ou *w*,*Canton S* âgées de 3 jours (Fig.R3). Pour explorer la possibilité d'une différence d'expression de *mnd* selon le genre, nous avons utilisé le couple d'amorces communes (Fig.R1). Il ne semble pas y avoir de différence significative lorsque l'on compare les expressions relatives des ARNs de *mnd* chez les mâles et les femelles, que ce soit dans un fond génétique *w*¹¹¹⁸ ou un fond génétique *CantonS* (Fig.R3). Il est possible que la quantité de transcrits *mnd* totaux soit similaire, mais que les proportions de chaque transcrit suivant le sexe soient différentes. Afin de tester cette hypothèse, des RT-qPCRs avec les couples d'amorces transcrits spécifiques seraient à envisager.

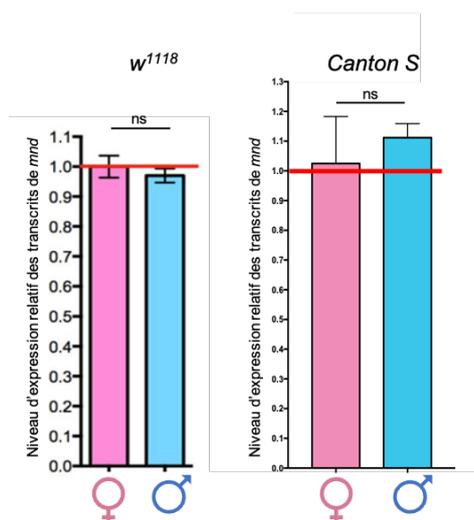


Fig. R3 : Le niveau d'expression relatif de *mnd* est similaire entre les sexes, dans un fond génétique *w¹¹¹⁸* et Canton S.

Le niveau d'expression relatif des ARNm de *mnd* déterminé par RTqPCR. Les extractions d'ARNs ont été faites avec des têtes d'individus *w¹¹¹⁸* (histogramme de gauche) femelles (rose) et mâles (bleu) ou sur têtes de drosophiles Canton S (histogramme de droite) femelles (rose) et mâles (bleu). Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés. ns : non significatif.

Après avoir confirmé la présence de deux transcrits de *mnd* dans la tête des drosophiles âgées de 3 jours, nous nous sommes intéressés à la localisation cellulaire de MND dans le cerveau adulte. Le cerveau est composé principalement de deux types cellulaires, les neurones et les cellules gliales. J'ai donc voulu, dans un premier temps, définir dans quel type de cellules MND était localisée. Pour cela, des immunomarquages ont été réalisés avec l'anticorps α -MND sur des cerveaux exprimant la protéine de fusion mCD8::GFP soit dans les neurones (*Elav-Gal4*>*UAS-mCD8::GFP*), soit dans les cellules gliales (*Repo-Gal4*>*UAS-mCD8::GFP*) (Fig.R4). Nous observons une colocalisation de ces deux marquages (α -MND et α -GFP) sur les cerveaux *Elav-Gal4*>*UAS-mCD8::GFP* (Fig.R4A), ainsi que sur les cerveaux *Repo-Gal4*>*UAS-mCD8::GFP* (Fig.R4B). Cela montre que MND est présent dans ces deux types cellulaires.

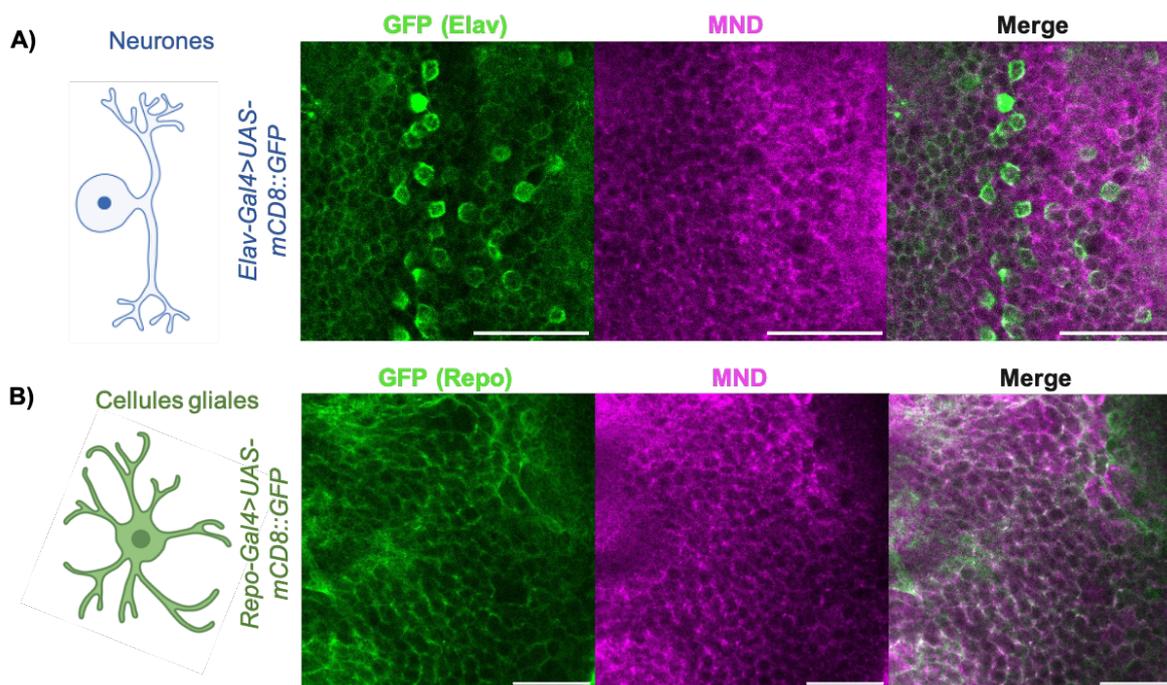


Fig. R4 : MND est présent dans les neurones et les cellules gliales du cerveau adulte.

Images représentatives de cerveaux (mâles âgés de 3 jours) exprimant la *mCD8::GFP* soit A) dans les neurones (*Elav-Gal4>UAS-mCD8::GFP*), soit B) dans les cellules gliales (*Repo-Gal4>UAS-mCD8::GFP*). Le signal GFP a été amplifié par un anticorps α -GFP (vert) et les cerveaux ont été immunomarqués avec un anticorps α -MND (magenta). La superposition des deux signaux montre leur colocalisation en blanc. La barre d'échelle représente 20 μ m.

La présence de MND dans deux types cellulaires différents suggère une régulation cellule spécifique de l'expression de *mnd*. Afin d'étudier cette régulation et de déterminer les séquences régulatrices contrôlant l'expression de *mnd* dans le cerveau, la région promotrice de *mnd* avait été analysée par études bio-informatiques par Anna Ziegler (qui a été post-doctorante dans l'équipe). Quatre séquences régulatrices potentielles avaient été ainsi identifiées et nommées *mnd*²⁴⁻¹, *mnd*²⁵⁻¹, *mnd*²⁶⁻¹ et *mnd*²⁷⁻¹ (Fig.R5A). Afin d'étudier le profil d'expression de ces différentes séquences régulatrices de *mnd*, des constructions génétiques avaient été réalisées. Cela a permis de générer des lignées transgéniques, dont le gène codant le facteur de transcription de levure *gal4* est sous la dépendance d'une des séquences régulatrices de *mnd*. Ces drivers Gal4 ont été générés en clonant les séquences régulatrices en amont de *gal4*, et insérées dans le génome au site attP2 (chromosome 3) ou attP40 (chromosome 2). Quatre lignées driver Gal4 ont été créées de cette façon. Ces outils doivent nous permettre de déterminer le profil d'expression de chaque séquence régulatrice de *mnd* dans le cerveau, en croisant ces nouvelles lignées Gal4 avec une lignée *UAS-mCD8::GFP*.

La figure R5 reprend les profils d'expression de *mCD8::GFP* induits par les quatre drivers Gal4 générés. La séquence régulatrice nommée *mnd*²⁴⁻¹, située en amont de l'exon 1, semble diriger une expression dans les neurones des CPs, notamment au niveau de ce qui semble être les lobes α/β et γ , ainsi que dans des cellules des lobes optiques (Fig.R5B). La séquence *mnd*²⁵⁻¹ permet une expression dans la glie corticale (Fig.R5C). Quant à la séquence *mnd*²⁶⁻¹, elle conduit à une expression de *mCD8::GFP* dans des cellules des lobes optiques (Fig.R5E). Enfin, la séquence *mnd*²⁷⁻¹ dirige l'expression dans ce qui semble être les lobes α/β des CPs, ainsi que dans des cellules connectant les lobes antennaires et la corne latérale, qui pourrait potentiellement être des interneurons olfactifs de 3^{ème} ordre (Mohamed *et al.*, 2019), ainsi que dans des cellules gliales du cerveau (Fig.R5D).

Ces résultats montrent que, dans le cerveau adulte, l'expression neuronale de *mnd* est dirigée, au moins en partie, par les séquences régulatrices *mnd*²⁴⁻¹ et *mnd*²⁷⁻¹. Dans les CPs, il semble que *mnd*²⁷⁻¹ soit restreint aux lobes α/β alors que *mnd*²⁴⁻¹ semble conduire à une expression dans les lobes γ des CPs en plus des lobes α/β . Quant à la séquence *mnd*²⁵⁻¹, elle semble induire une expression gliale spécifique.

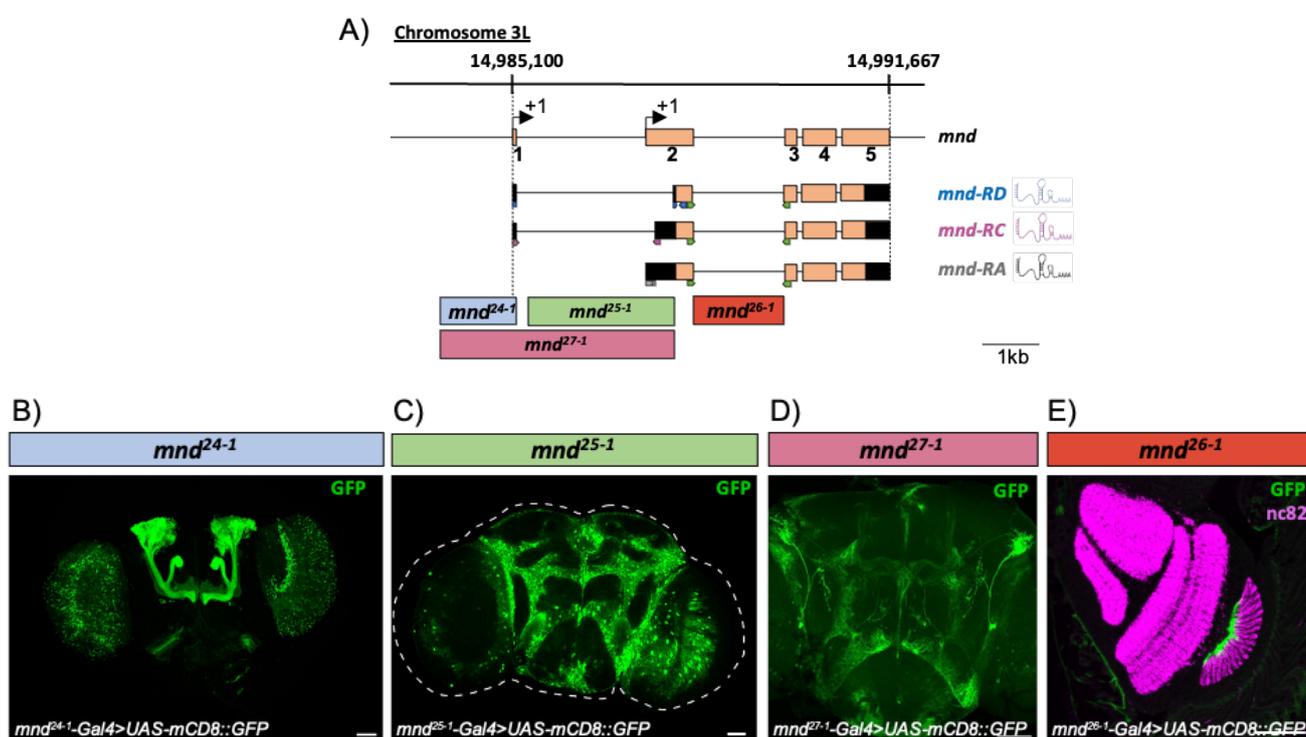


Fig. R5 : Profil d'expression des différentes séquences régulatrices de *mnd*.

A) Schéma représentant les différentes séquences régulatrices de *mnd*. La séquence *mnd*²⁴⁻¹ est symbolisée par le rectangle bleu, *mnd*²⁵⁻¹ par le rectangle vert, *mnd*²⁶⁻¹ par le rectangle rouge et *mnd*²⁷⁻¹ par le rectangle rose. Les reconstructions de cerveaux par Z projection (mâles âgés de 3 jours) exprimant la *mCD8::GFP* sous la régulation des différentes séquences régulatrices de *mnd*. B) *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>*mCD8::GFP*, C) *mnd*²⁵⁻¹-Gal4>*mCD8::GFP*, D)

mnd²⁷⁻¹-Gal4>mCD8::GFP et *E mnd²⁶⁻¹-Gal4>mCD8::GFP*. Le signal GFP a été amplifié par un anticorps α -GFP (vert). La barre d'échelle représente 50 μ m.

La séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹*, de 1 346pb, est localisée sur l'exon 1, partagé par le transcrit *mnd-RC* mais inexistant chez le *mnd-RA* (Fig.R5A) suggérant que *mnd²⁴⁻¹* dirige l'expression de *mnd-RC* dans les neurones (Fig.R5B). La séquence *mnd²⁵⁻¹*, de 2 581pb, est localisée sur l'intron 1 et une partie UTR de l'exon 2, partagé par *mnd-RA* et *mnd-RC* (Fig.R5A), laissant supposer que cette séquence dirige l'expression de *mnd-RA*, *mnd-RC* dans les cellules gliales (Fig.R5C). Alors que, la séquence *mnd²⁶⁻¹* de 1 805pb, incluant l'exon 2 et quelques nucléotides de l'exon 3, partagés par les deux transcrits (Fig.R5A), laisse supposer que cette séquence dirige l'expression de *mnd-RA* et *mnd-RC* dans les lobes optiques (Fig.R5E). La séquence *mnd²⁷⁻¹*, de 3 922pb, semble recouvrir les deux séquences *mnd²⁴⁻¹* et *mnd²⁵⁻¹* (Fig.R5A) et pourrait potentiellement diriger l'expression des deux transcrits dans les neurones et les cellules gliales (Fig.R5D).

Il est important de noter qu'Anna Ziegler a montré une expression de *mnd²⁴⁻¹* dans l'intestin (Fig.R6). De même, lors de mes dissections des individus *mnd²⁴⁻¹>UAS-mCD8::GFP*, j'ai observé la présence de GFP au niveau de l'intestin, la jonction des ailes, le proboscis, et au niveau du jabot. La nature des cellules exprimant la GFP dans ces tissus n'est pas encore définie.

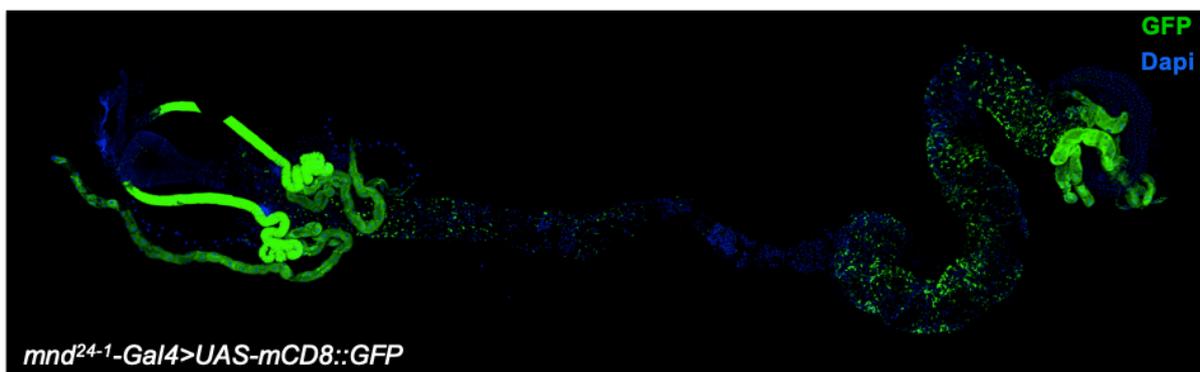


Fig. R6 : Profil d'expression de *mnd²⁴⁻¹* dans l'intestin.

Image d'un intestin exprimant la *mCD8::GFP* sous la régulation de *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et amplifié par un anticorps α -GFP (vert). Les noyaux sont marqués au Dapi (bleu). Image réalisée par Anna Ziegler.

2. Profil d'expression de *mnd*²⁴⁻¹ dans les CPs

Au cours de mon étude, je me suis principalement intéressée à la séquence *mnd*²⁴⁻¹ qui semble être exprimée les corps pédonculés (CPs). Cette structure présentée en introduction est un centre intégratif des signaux sensoriels essentielle à la mémoire olfactive et intervient dans la modulation de multiples comportements. La dérégulation de *mnd* par ARNi dans cette structure devrait nous permettre d'étudier la fonction de MND par l'analyse de l'activité neuronale des CPs et du comportement.

Afin d'affiner le profil d'expression de *mnd* dans les neurones des CPs dirigé par la séquence régulatrice *mnd*²⁴⁻¹, un driver *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* a été généré afin de nous permettre d'effectuer des expériences d'intersections d'expression génétique (Cf. Partie 1.B4 « Matériel et Méthodes »). Nous pourrions ainsi déterminer avec plus de précision dans quels types de neurones des CPs *mnd* est exprimé sous le contrôle de la séquence régulatrice *mnd*²⁴⁻¹, et nous pourrions évaluer la présence de MND dans ces cellules par immunomarquage. Déterminer la nature des neurones exprimant *mnd* permettra de nous donner des indications sur les comportements régulés par les CPs qui pourrait potentiellement impliquer MND.

En premier lieu, le profil d'expression de nos drivers *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* et *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* ont été caractérisés pour s'assurer que ces outils génétiques reflètent bien le profil d'expression de MND. Pour cela, des cerveaux ont été immunomarkés avec l'anticorps α -MND et un α -GFP pour amplifier le signal de notre rapporteur *mCD8::GFP*, qui est exprimé sous la régulation de *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* (Fig.R7 et Fig.R8) ou *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (Fig.R9).

Pour *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*UAS-mCD8::GFP* (Fig.R7), une expression de la GFP est observée dans les CPs, possiblement dans les lobes α/β et plus faiblement dans les lobes γ , dans les lobes optiques (Fig.R7A) et plus faiblement dans le corps ellipsoïde (Fig.R8). Les neurones des CPs exprimant la GFP semblent exprimer également MND. En effet, une colocalisation partielle des deux signaux α -GFP et α -MND au niveau des corps cellulaires des neurones des CPs est observée (Fig.R7C). Cela laisse supposer qu'une partie de l'expression de MND dans les neurones des CPs est dirigée par la séquence *mnd*²⁴⁻¹ et qu'il existerait une autre séquence régulatrice de *mnd* conduisant à une expression dans les CPs (indépendamment de *mnd*²⁴⁻¹). Il est possible que ce soit la

séquence *mnd*²⁷⁻¹ qui est aussi exprimée dans les CPs (Fig.R5D). La section du pédoncule semble confirmer l'expression de *mnd*²⁴⁻¹ dans les KC α/β et γ (Fig.R7D). Les KCs projettent leur axone en formant des neuropiles qui vont s'organiser d'une manière bien précise afin de former le pédoncule et les différents lobes. Avec *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*, la GFP est présente dans les zones correspondant aux axones des KC α/β et faiblement dans les KC γ . Il semble que la GFP soit présente également dans les KC α/β c qui sont les KCs dernièrement formées lors du développement. De plus, la GFP semble absente des KC α'/β' (Fig.R7D).

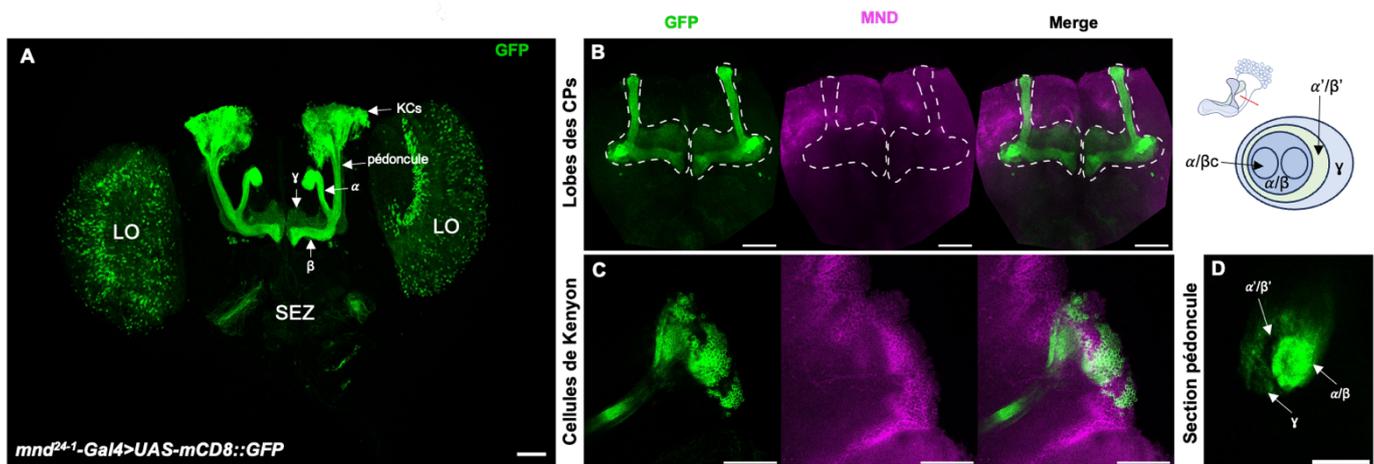


Fig. R7 : Profil d'expression de *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*.

A) Z projection représentative de cerveau exprimant la mCD8 ::GFP sous la régulation de *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>mCD8 ::GFP). Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP (vert). n=10. La barre d'échelle = 50 μ m. B) Z projections représentatives des lobes des CPs. C) Images représentatives des KCs immunomarquées avec l' α -MND (magenta) et l' α -GFP (vert). La colocalisation des deux marqueurs (blanc) est visible au niveau des corps cellulaires mais pas au niveau des lobes des CPs. La barre d'échelle = 50 μ m. D) Image de la section du pédoncule montrant la GFP dans les axones des KC α/β et γ . La barre d'échelle = 20 μ m. LO : lobe optique ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

De manière intéressante, dans les cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*nls*::GFP, le noyau de cellules présentes dans la Pars Intercerebralis (PI) sont marqués (Fig.R8B). Ces cellules pourraient être les IPCs, qui, chez la larve expriment MND (Manière *et al.*, 2016 ; Ziegler *et al.*, 2018). Ce qui laisse supposer que la séquence régulatrice *mnd*²⁴⁻¹ dirige l'expression de MND dans les IPCs. De plus, des cellules appartenant au complexe central semblent également exprimer la GFP (Fig.R8A). Cependant, aucun marquage α -MND n'est observé dans cette structure, suggérant l'absence de la protéine MND dans ces cellules.

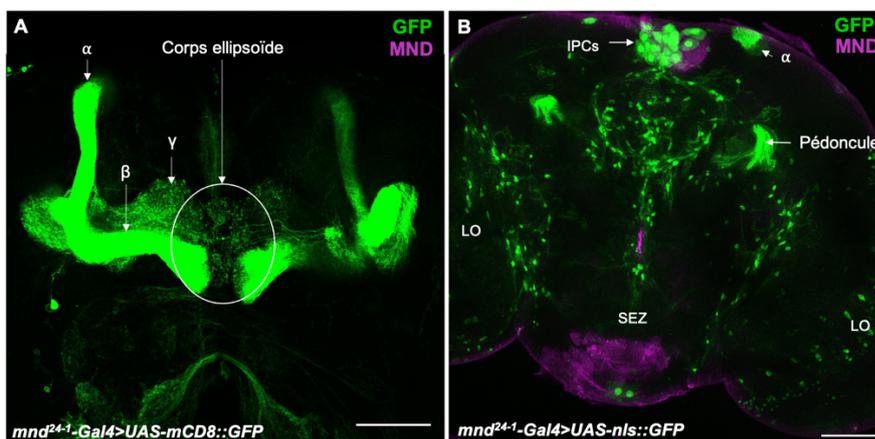


Fig. R8 : Profil d'expression de mnd^{24-1} -Gal4 dans le corps ellipsoïde et les IPCs.

A) Z projection représentative de cerveau mnd^{24-1} -Gal4>UAS-mCD8::GFP au niveau des lobes des CPs et du corps ellipsoïde. B) Image représentative de cerveau mnd^{24-1} -Gal4>UAS-nls::GFP. Les cerveaux ($n=10$) ont été immunomarqués avec un anticorps α -GFP (vert) et α -MND (magenta). La barre d'échelle = 50 μ m. LO : lobe optique ; SEZ : zone sous-œsophagienne ; IPCs : cellules productrices d'insuline.

Pour mnd^{24-1} -LexA (Fig.R9), le profil d'expression de la GFP apparaît bien plus ubiquitaire au sein du cerveau que mnd^{24-1} -Gal4. Ces deux constructions ont été pourtant générées avec la même séquence régulatrice de mnd (mnd^{24-1}) et ont été insérées au même locus (attP2) dans le génome. Cette différence de profil d'expression entre un driver Gal4 et un driver LexA avec la même séquence régulatrice a également été remarqué par Deng et collaborateurs (2019). La GFP semble être présente dans les lobes α/β , dans un grand nombre de cellules des lobes optiques et du cortex (Fig.R9A). Le marquage α -MND colocalise en partie avec la GFP au niveau des KCs (Fig.R9C). La section du pédoncule nous montre une expression de la GFP uniquement dans les KC α/β les plus précoces et aucune expression dans les KC α/β c nouvellement formées (Fig.R9D). Cela peut laisser supposer que notre outil mnd^{24-1} -LexA est différemment exprimer en fonction d'une certaine fenêtre développementale par rapport à notre outil mnd^{24-1} -Gal4, qui lui est exprimé dans les KC α/β c. Ces résultats montrent que nos outils ne sont pas équivalents, mais que nos outils créés avec la séquence régulatrice mnd^{24-1} reflètent bien une partie de l'expression neuronale de MND.

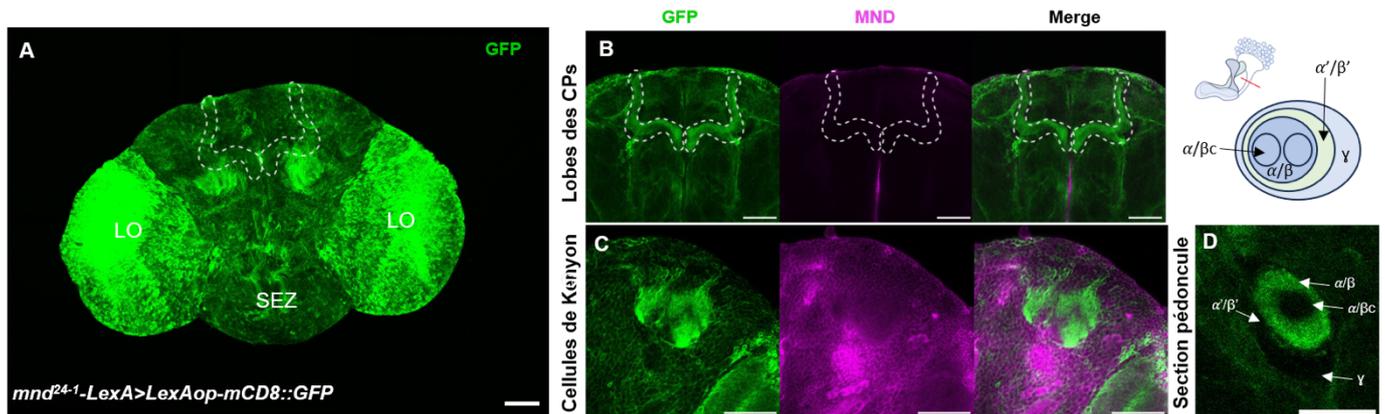


Fig. R9 : Profil d'expression de mnd^{24-1} -LexA.

A) Z projection représentative de cerveau exprimant la $mCD8::GFP$ sous la régulation de mnd^{24-1} -LexA (mnd^{24-1} -LexA> $mCD8::GFP$). Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP (vert). $n=7$. La barre d'échelle = $50\mu m$. B) Z projections représentatives des lobes des CPs. C) Images représentatives des KCs immunomarquées avec l' α -MND (magenta) et l' α -GFP (vert). La colocalisation des deux marqueurs (blanc) est visible au niveau des corps cellulaires mais pas au niveau des lobes des CPs. La barre d'échelle = $50\mu m$. D) Image représentative de la section du pédoncule montrant la GFP dans les axones des KC α/β . La barre d'échelle = $20\mu m$. LO : lobe optique ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Afin de connaître les cellules ciblées communément par nos deux drivers, une intersection d'expression génétique a été réalisée (mnd^{24-1} -Gal4>UASstop $mCD8::GFP$; mnd^{24-1} -LexA>LexAop-FLP) (Fig.R10). La GFP est spécifiquement exprimée par les KC α/β , révélant que seules ces KCs expriment conjointement les deux drivers (Fig.R10A). Les sections du pédoncule montrent l'absence de GFP dans les KC α/β core, montrant que ces neurones n'expriment pas communément nos deux drivers (Fig.R10D). Cela est cohérent avec le fait que mnd^{24-1} -LexA ne cible pas ces neurones (Fig.R9D). Ainsi, les neurones exprimant communément les drivers mnd^{24-1} sont du type KC α/β .

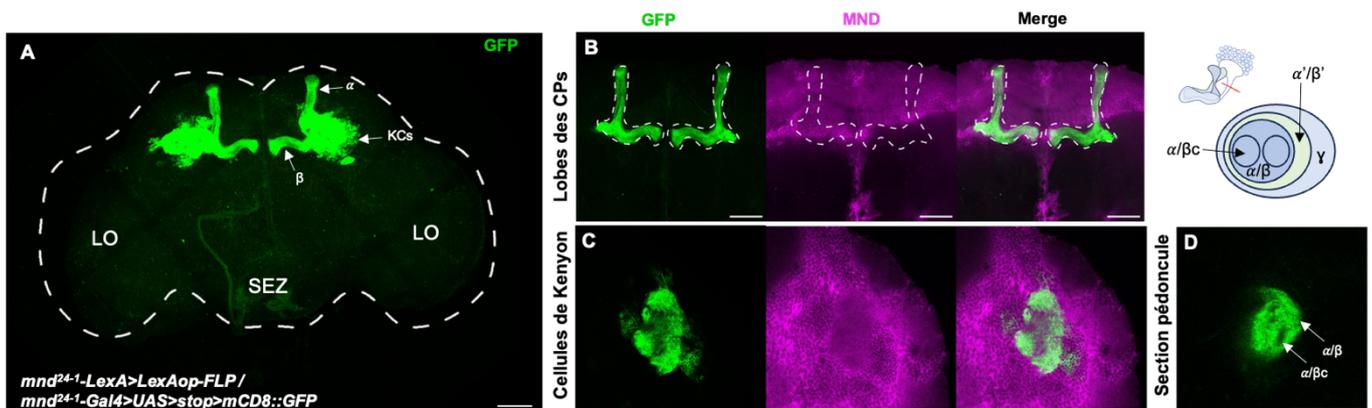


Fig. R10 : Cellules exprimant communément mnd^{24-1} -Gal4 et mnd^{24-1} -LexA.

A) Z projection représentative de cerveau exprimant la $mCD8::GFP$ dans les cellules exprimant communément deux outils mnd^{24-1} -Gal4 et mnd^{24-1} -LexA (mnd^{24-1} -LexA>LexAop-FLP/ mnd^{24-1} -Gal4>UAS>stop> $mCD8::GFP$). Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP (vert). $n=6$. La barre d'échelle = $50\mu m$. B) Z projections

représentatives des lobes des CPs. C) Images représentatives des KCs immunomarquées avec l' α -MND (magenta) et l' α -GFP (vert). La colocalisation des deux marqueurs (blanc) est visible au niveau des corps cellulaires mais pas au niveau des lobes des CPs. La barre d'échelle = 50 μ m. D) Image de la section du pédoncule montrant la GFP dans les axones des KC α/β . La barre d'échelle = 20 μ m. LO : lobe optique ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

De manière intéressante, le marquage α -MND se retrouve au niveau des corps cellulaires des KCs et ne semble pas être présent au niveau du pédoncule ou des lobes formés par les axones des KCs. Ce qui suggère que la protéine MND est présente au niveau des membranes des corps cellulaires uniquement. Cette localisation donne des indices sur la potentielle fonction de MND dans ces neurones. En effet, le fait que MND ne soit pas retrouvée au niveau des lobes laisse supposer que MND n'intervient pas, en tout cas directement, au niveau des synapses KCs>DANs et KCs>MBONs définissant les compartiments fonctionnels des CPs au niveau des lobes (Aso *et al.*, 2014). La présence de MND au niveau des calices reste à déterminer avec certitude. En effet, certains cerveaux ne montrent pas de marquage α -MND dans cette zone synaptique, alors que pour d'autres cerveaux le marquage α -MND est nettement visible dans cette zone. Cela peut laisser supposer un potentiel rôle de MND au niveau des synapses entre les PNs et les KCs, jouant potentiellement un rôle dans la modulation du message nerveux olfactif apporté par les PNs (Caron *et al.*, 2013 ; Aso *et al.*, 2014 ; Zheng *et al.*, 2018) ou d'autres signaux sensoriels (gustatifs, visuels, thermiques) (Li *et al.*, 2020).

Maintenant que nos outils génétiques ont été vérifiés et reflètent bien une partie de l'expression de MND dans le cerveau adulte, nous avons voulu déterminer avec certitude dans quel(s) lobe(s) des CPs la région régulatrice *mnd*²⁴⁻¹ dirige l'expression de *mnd*. Pour cela nous avons utilisé la stratégie d'intersection génétique. Des lignées drivers Gal4 lobes spécifiques (Aso *et al.*, 2009) ont été utilisés avec *mnd*²⁴⁻¹-LexA. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les drivers Gal4 soient bien spécifiques de chaque lobe en exprimant un rapporteur, mCD8 ::GFP sous leur contrôle.

Pour les KC α/β , nous avons utilisé le driver *c739-Gal4*. Nos cerveaux *c739-Gal4* >*UAS-mCD8* ::GFP montrent une expression spécifique de la GFP dans les neurones α/β , ainsi que dans des neuropiles au niveau du SEZ (Fig.R11A). Dans les corps cellulaires des KC α/β , une colocalisation partielle du marquage α -MND et α -GFP indique que MND est présent au niveau de ces KCs (Fig.R11A). Le driver *c305a-Gal4* permet l'expression de la GFP dans les KC α'/β' (*c305-Gal4* >*UAS-mCD8* ::GFP). Le

marquage α -MND est visible dans les corps cellulaires et colocalise en partie avec le marquage α -GFP (Fig.R11B). Avec le driver *H24-Gal4*, la GFP est exprimée dans les $KC\gamma$ et une colocalisation de la GFP et du marquage anti-MND est visible dans les corps cellulaires des $KC\gamma$ (Fig.R11C). La GFP est également observée dans les lobes antennaires, le corps ellipsoïde, dans les lobes optiques et des cellules dans le SEZ avec ce driver. Pour finir, nous avons utilisé le driver *OK107-Gal4* qui conduit à une expression de la GFP dans toutes les KCs (cerveaux *OK107-Gal4 >UAS-mCD8 ::GFP*) (Fig.R11D). La GFP est aussi présente dans des cellules de la Pars Intercerebralis qui semblent être les IPCs, dans des cellules des lobes optiques et des cellules ressemblent aux neurones latéraux impliqués dans le rythme circadien, les Lateral clock Neurons (LcN) (Reinhard *et al.*, 2022). Nos observations sont en adéquation avec la littérature (Aso *et al.*, 2009).

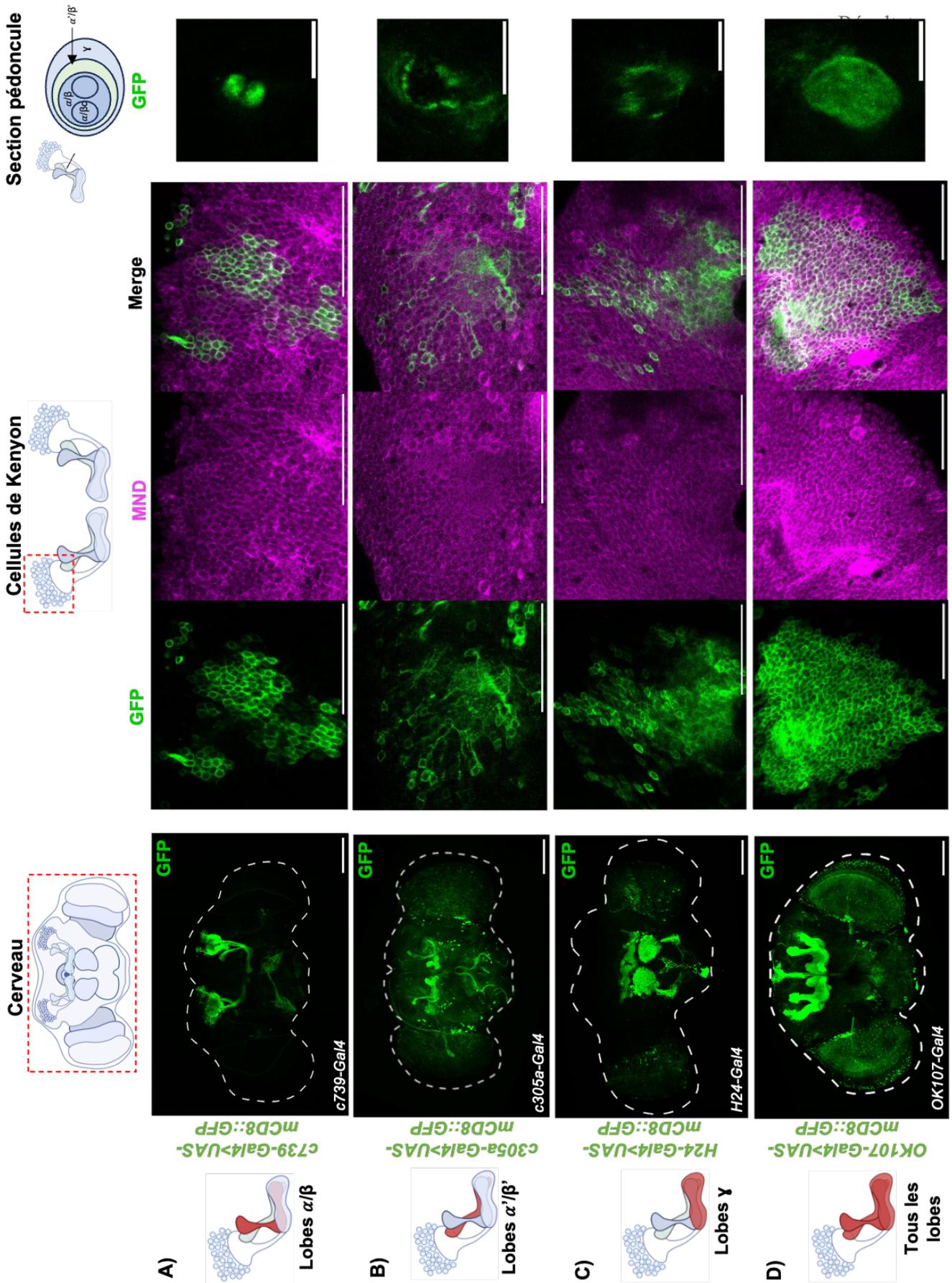


Fig. R11 : Profil d'expression des différents drivers Gal4 spécifiques des lobes des CPs.

Z projections (cerveaux *in toto*) et images représentatives de l'expression de mCD8 ::GFP sous le contrôle de c739-Gal4 spécifique des lobes α/β (A), sous le contrôle de c305a-Gal4 spécifique des lobes α'/β' (B), sous le contrôle de

H24-Gal4 spécifique des lobes γ (C), et sous le contrôle de *OK107-Gal4* exprimé dans tous les lobes (D). Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP. Les images des KCs montrent le marquage α -MND (magenta) et sa colocalisation avec α -GFP (merge). $n=6-10$. Les barres d'échelles = $50\mu\text{m}$. Des images représentatives de sections de pédoncules montrent le marquage α -GFP. La barre d'échelle = $20\mu\text{m}$

Après les vérifications de ces drivers Gal4 lobes spécifiques, nous avons procédé aux intersections d'expression génétique en utilisant le driver *mnd²⁴⁻¹-LexA*.

L'intersection de *c739-Gal4* avec *mnd²⁴⁻¹-LexA* conduit à une expression de la GFP dans les KC α/β confirmant ainsi que *mnd* est exprimé dans ces cellules sous la dépendance de la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹* (Fig.R12A). Les marquages α -GFP et α -MND au niveau des corps cellulaires des neurones montrent une colocalisation, ce qui confirme la présence de MND dans les KC α/β . De plus, cette intersection révèle une autre structure, le corps ellipsoïde qui exprime la GFP. Cela suggère que la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹* s'exprime dans ces cellules, cependant, le marquage α -MND ne montre pas la présence de MND dans ces cellules.

Pour l'intersection de *H24-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA*, la GFP est exprimée dans les KC γ , confirmant l'expression de *mnd* dans ces neurones (Fig.R12C). De plus, la colocalisation des immunomarquages α -GFP et α -MND montre la présence de la protéine MND dans ces neurones KC γ . Cette intersection génétique dévoile une expression de la GFP dans le corps ellipsoïde. Cela suggère que *mnd²⁴⁻¹* s'exprime dans ces cellules, cependant, le marquage α -MND ne montre pas la présence de MND dans ces cellules.

A contrario, l'intersection avec le driver *c305a-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA* ne montre aucune expression de la GFP dans les KC α'/β' , indiquant que la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹* ne dirige pas l'expression de *mnd* dans les KC α'/β' (Fig.R12B). Cependant, l'immunomarquage α -MND indique que la protéine MND est pourtant présente dans ces neurones (Fig.R11B). Ce qui suggère que MND est exprimée dans toutes les KCs des CPs, mais que son expression ne semble pas être régulée par les mêmes séquences régulatrices. En effet, l'expression de *mnd* est sous la dépendance de la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹* pour les KC α/β et KC γ , alors que dans les KC α'/β' l'expression de *mnd* semble être indépendante de la séquence *mnd²⁴⁻¹* (Fig.R12B).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé le driver *OK107-Gal4* exprimé dans toutes les KCs (Fig.R11D). L'intersection de ce driver avec *mnd²⁴⁻¹-LexA* soutient nos résultats précédents. La GFP est présente dans les KC α / β et KC γ mais pas dans les KC α' / β' (Fig. R12D). Cette intersection révèle également que des cellules de la Pars Intercerebralis, possiblement les IPCs expriment de la GFP suggérant l'expression de *mnd* sous *mnd²⁴⁻¹* dans ces cellules. De même, les LcNs apparaissent GFP positives, suggérant une expression de *mnd* sous *mnd²⁴⁻¹* dans ces cellules.

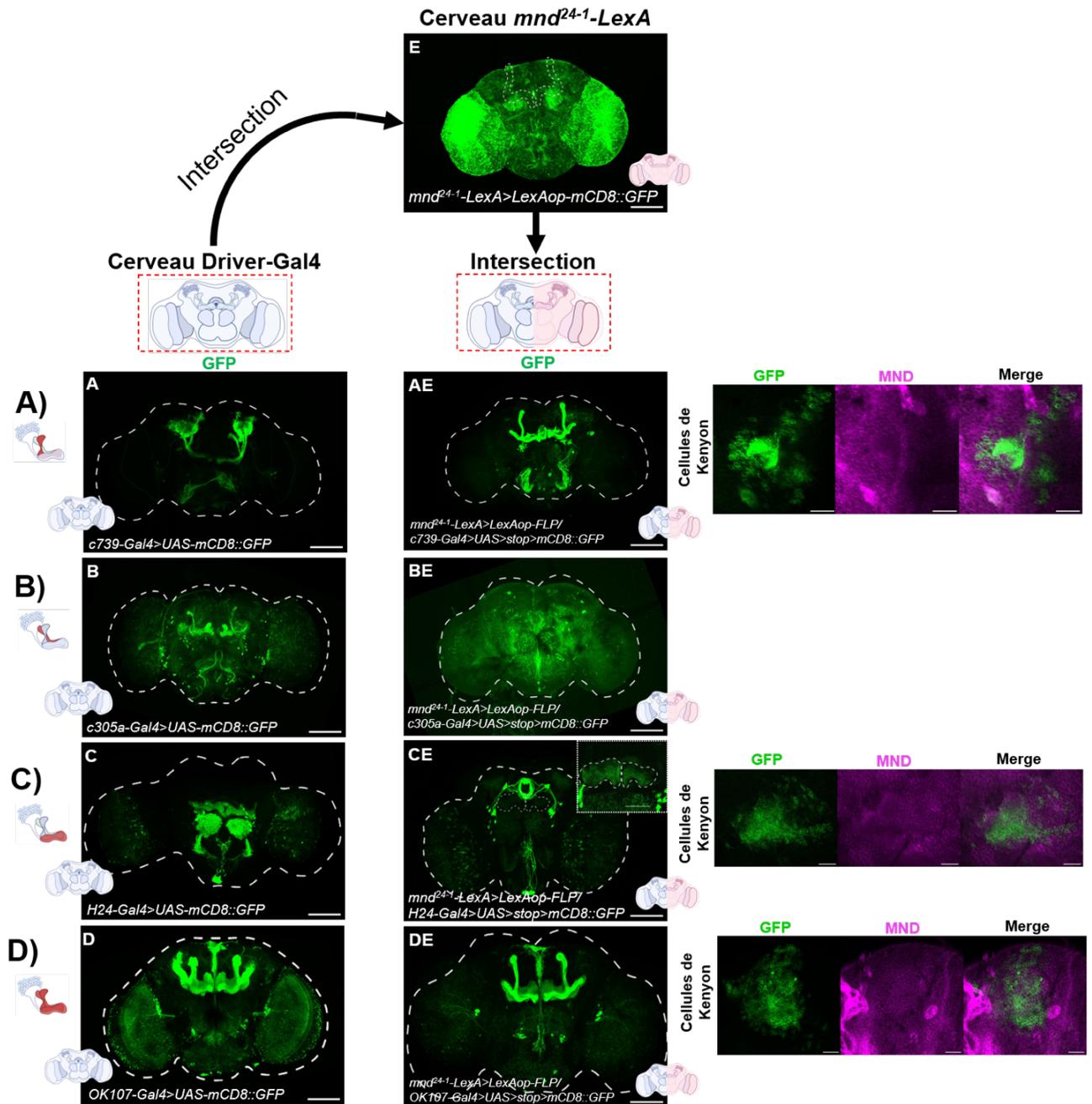


Fig. R12 : Intersection d'expression génétique entre *mnd²⁴⁻¹-LexA* et les différents drivers spécifiques des CPs.

Z projections représentatives de cerveaux in toto exprimant la mCD8::GFP sous la régulation de A) *c739-Gal4* (KC α / β) ou B) *c305a-Gal4* (KC α' / β') ou C) de *H24-Gal4* (KC γ) ou D) sous le contrôle de *OK107-Gal4* (toutes les

KCs) et E) *mnd*²⁴⁻¹-*LexA*. Les Z projections représentatives des cerveaux in toto montrant le profil d'expression des cellules exprimant communément *mnd*²⁴⁻¹ (E) et les différents drivers CPs spécifiques sont nommés AE), BE), CE et DE, respectivement. Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP. $n=8-9$. La barre d'échelle = 50 μ m. Les images représentatives du marquage α -GFP et α -MND au niveau des KCs sont montrées à droite de la figure. La barre d'échelle = 20 μ m.

En conclusion de ces expériences d'intersection d'expression génétique, il semble que la séquence régulatrice *mnd*²⁴⁻¹ dirige l'expression de *mnd* dans les KC α / β et KC γ mais pas dans les KC α' / β' (Fig.R12). La protéine MND est bien présente dans les KC α' / β' , comme le montre les immunomarquages (Fig.R11B), cependant cette expression ne semble pas être régulée par la séquence *mnd*²⁴⁻¹. Cela laisse supposer qu'une autre séquence régulatrice dirige l'expression de *mnd* dans les KC α' / β' . Il n'est pas exclu que ce soit la séquence *mnd*²⁷⁻¹ qui dirige cette expression. En effet, le profil d'expression de la GFP dirigée par le driver *mnd*²⁷⁻¹-*Gal4* montre une expression dans les neurones des CPs (Fig. R5D). Des études d'intersections d'expression serait à faire avec *mnd*²⁷⁻¹ et *c739* (lobes α / β) ainsi que *c305* (lobes α' / β') afin de vérifier cette hypothèse.

De plus, ces expériences semblent révéler que d'autres cellules expriment *mnd*²⁴⁻¹, potentiellement les IPCs dans la PI, les LcNs et des cellules du SEZ (potentiellement des neurones octopaminergiques impliqués dans la régulation des comportements alimentaires (Youn, *et al.*, 2018)). Des études plus approfondies d'intersection d'expression permettraient de vérifier ces hypothèses, et déterminer la régulation de l'expression de *mnd* dans ces cellules.

Ces expériences ont permis de définir le profil d'expression de *mnd*²⁴⁻¹ dans les CPs. Cependant, il est difficile d'évaluer si toutes les KC α / β et KC γ expriment *mnd*²⁴⁻¹ ou uniquement une sous-population de ces neurones. Comme expliqué en introduction, chaque sous-population de KCs semble être impliquée dans des régulations spécifiques. Identifier précisément les neurones exprimant *mnd* nous donnera des indications quant à la fonction neuronale de MND. Des sections de pédoncules laissent supposer que les KC α / β core n'expriment pas *mnd*²⁴⁻¹ (Fig.R9D, Fig.R10D). Afin de répondre à cette question, des cerveaux de drosophile exprimant le rapporteur nls::RFP sous le contrôle de *mnd*²⁴⁻¹-*LexA*, et simultanément, le rapporteur nls::GFP sous le contrôle de *c739*-*Gal4* (spécifique des KC α / β) ont été analysés

(Fig.R13). Si toutes les KC α / β expriment *mnd*²⁴⁻¹ alors elles devraient toutes être RFP et GFP positives.

L'analyse de ces cerveaux montre une colocalisation incomplète des deux rapporteurs, soulignant le fait que *mnd*²⁴⁻¹ n'est exprimé que dans une partie des KC α / β ciblées par *c739-Gal4*. Le driver *c739-Gal4* est connu pour cibler toutes les KC α / β (McGuire *et al.*, 2001 ; Aso *et al.*, 2009 ; Perisse *et al.*, 2013). De plus, les sections de pédoncule montrent bien une différence de marquage et laisse supposer que *mnd*^{24-1-LexA} ne dirige pas l'expression de la RFP dans les KC α / β core (Fig.R13). Le marquage α -MND semble être présent autour des cellules nls ::RFP positives ainsi que nls ::GFP positives suggérant une localisation de MND au niveau de la membrane plasmique des KC α / β (Fig.R13). Cela souligne la possibilité d'une sous-population de KC α / β qui exprimeraient MND sous la régulation de *mnd*²⁴⁻¹ et une autre sous-population de KC α / β exprimant MND indépendamment de la séquence régulatrice *mnd*²⁴⁻¹.

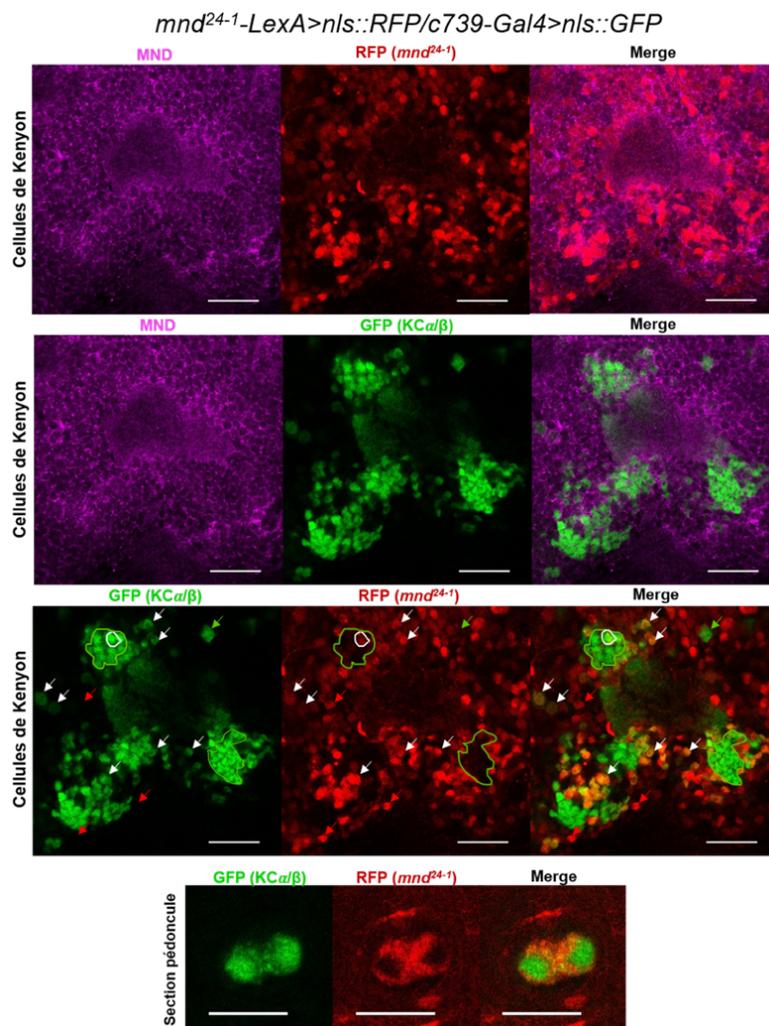


Fig. R13 : Profil d'expression de *mnd*^{24-1-LexA} dans les KC α / β .

Images représentatives des $KC\alpha\beta$ (vert) de cerveaux $c739-Gal4>UAS-nls::GFP/mnd^{24-1}-LexA>LexAop-nls::RFP$ immunomarkés par α -MND (magenta). La RFP sous le contrôle de $mnd^{24-1}-LexA$ et la GFP sous le contrôle de $c739-Gal4$. Le marquage α -MND se trouve autour des cellules RFP+, confirmant la présence de MND dans les cellules mnd^{24-1} . La GFP permet d'identifier les $KC\alpha\beta$, la RFP est exprimée dans les cellules mnd^{24-1} , et leur colocalisation partielle (jaune) identifie une sous-population de $KC\alpha\beta$ exprimant mnd^{24-1} . Les images représentatives des sections de pédoncule montrent une différence d'expression de la GFP et la RFP, confirmant qu'une sous-population de $KC\alpha\beta$ exprime mnd^{24-1} . $n=6$. La barre d'échelle représente $20\mu m$.

La plupart des expériences de colocalisation de MND avec les différents drivers ont été réalisées à partir d'une expression membranaire de la GFP ($mCD8::GFP$) et d'un immunomarquage de MND. Cependant, MND ne semble pas être restreint uniquement à la membrane plasmique (Manière *et al.*, 2016). Comme MND est une protéine transmembranaire faisant partie des SLC7A, il est possible que MND se localise à la membrane du réticulum endoplasmique et potentiellement permettre le passage des AAs afin de réguler l'homéostasie locale utile à la synthèse de protéine ou des modifications post-traductionnelles. MND pourrait aussi être potentiellement recruté au niveau du lysosome comme LAT1, orthologue de MND, par LAPTM4B pour activer mTORC1 (Milkereit *et al.*, 2015).

Pour déterminer si MND est localisée au niveau du réticulum endoplasmique dans les KCs, j'ai fait un marquage α -MND sur des cerveaux exprimant la protéine de fusion $KDEL::GFP$ (Fig.R14). KDEL est une protéine intégrée à la membrane du RE et également au sein des vésicules issues du RE pour rejoindre l'appareil de Golgi. Les analyses des cerveaux $mnd^{24-1}-Gal4>RFP;KDEL::GFP$ montrent une colocalisation des deux signaux α -MND (Magenta) et α -GFP (KDEL) (vert) dans les KCs. Ces résultats montrent que MND semble être localisée au niveau du réticulum endoplasmique et au niveau de la membrane plasmique.

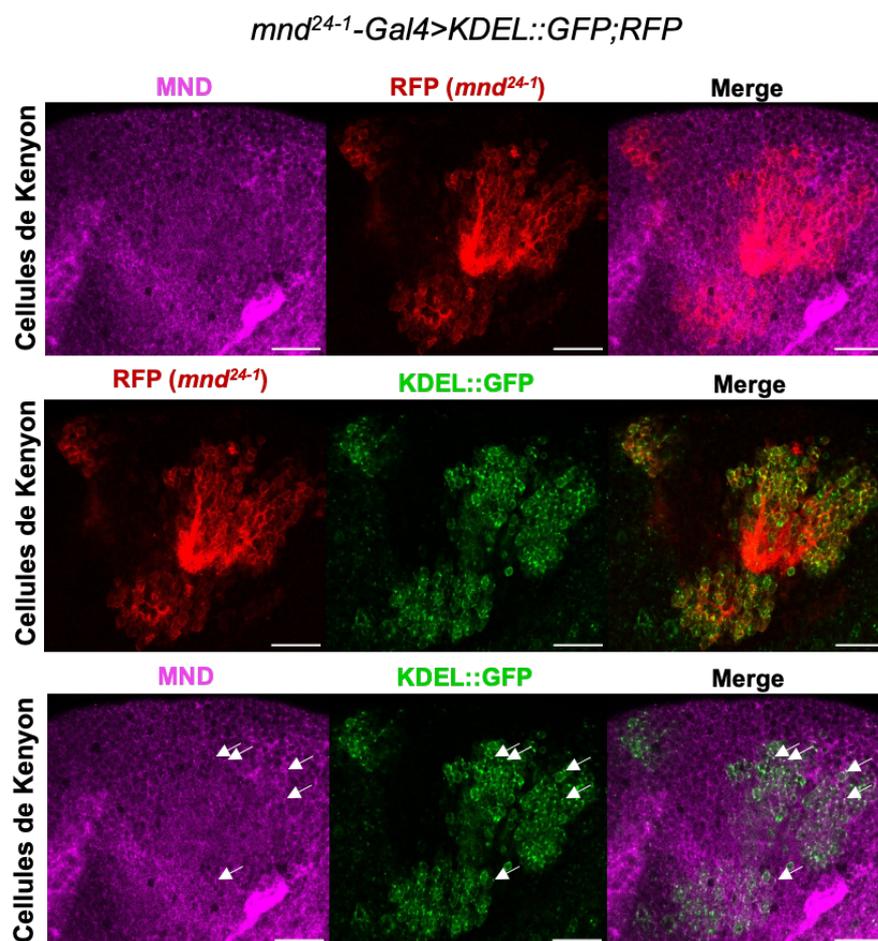


Fig. R14 : MND semble être localisée à la membrane du réticulum endoplasmique des KCs.

Images représentatives de cerveaux *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-mcherry ;KDEL ::GFP* immunomarkés par α -MND (magenta). Le marquage α -MND se trouve au niveau des cellules RFP +, confirmant la présence de MND dans les cellules *mnd²⁴⁻¹*. KDEL ::GFP est exprimée dans les cellules *mnd²⁴⁻¹* (leur colocalisation en jaune). Le marquage MND semble colocaliser en certains points avec KDEL ::GFP, suggérant une localisation de MND dans le RE. $n=5$. Les barres d'échelle représentent 20 μ m.

Pour confirmer ce résultat, des analyses complémentaires restent à faire. Des ultracentrifugations avec gradient permettraient de séparer les composants cellulaires afin d'isoler les protéines insérées dans les membranes du RE, mitochondriales, lysosomales, endosomes et analyser la présence de MND en Western-Blot.

Ainsi, après avoir caractérisé les neurones où MND est présent, sa localisation cellulaire et son expression sous la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹*, l'étude de la dérégulation de l'expression de *mnd* dans ces neurones devrait permettre de déterminer son rôle neuronal.

3. Fonction de MND dans les neurones α/β des CPs

MND est décrit comme un transporteur d'acides aminés de type LAT, connu pour transporter la leucine (Reynolds *et al.*, 2009). Il est donc possible que MND joue un rôle dans l'homéostasie des AAs dans les neurones l'exprimant. Afin de tester cette hypothèse, l'imagerie calcique fonctionnelle a été utilisée pour suivre l'activité neuronale des lobes des CPs en réponse à la présence d'acides aminés en temps réel. Nous avons dans un premier temps déterminé quel(s) AA(s) peu(ven)t activer les KCs puis déterminer si cette réponse est impactée par la dérégulation de *mnd* par ARNi dans les KCs.

Nous avons commencé par déterminer la concentration adéquate de L-AA, ainsi que l'âge des individus auquel les CPs sont les plus stimulables par un L-AA. Pour ce faire, nous avons choisi de tester différentes concentrations de L-Glu, qui est un L-AA, mais qui peut aussi directement jouer le rôle de neurotransmetteur. Nous avons testé cinq concentrations couramment utilisées chez la drosophile (Hamasaka *et al.*, 2007 ; Xia *et al.*, 2005 ; Han *et al.*, 2015 ; Zhao et Karpac, 2021 ; Park *et al.*, 2022) : 0 ; 0,2 ; 2 ; 10 et 20 mM sur des cerveaux d'individus âgés de 3, 6 ou 9 jours. Pour visualiser et mesurer l'activité des CPs, un senseur calcique (GCaMP6s) a été exprimé dans les CPs grâce au driver *mnd²⁴⁻¹-Gal4*. Le niveau de fluorescence dépend de l'activité neuronale (Cf. Partie 5 « Matériel et Méthodes »). Pour chaque âge (3, 6 ou 9 jours), l'activité calcique basale des lobes des CPs témoins (cerveaux *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s* avec 0mM de L-Glu) est comparée à l'activité de ces mêmes lobes après application de L-Glu à différentes concentrations (0,2 ; 2 ; 10 ou 20 mM). Les moyennes \pm SEM des pics d'intensité de fluorescence pour chaque concentration de L-Glu et chaque âge sont représentées dans la figure R15.

Les résultats montrent que les CPs sont activés, directement ou indirectement, par 20 mM de L-Glu, de manière significative à tous les âges (à 3 jours $\Delta F/F_0 = 7,63 \pm 1,41$; à 6 jours $\Delta F/F_0 = 3,92 \pm 1,35$; et à 9 jours $\Delta F/F_0 = 2,53 \pm 0,50$) (Fig.R15). Pour l'âge de 3 jours, 10 mM et 20 mM de L-Glu stimulent de manière significative les lobes des CPs, contrairement aux autres âges pour lesquels 10 mM de L-Glu ne semblent pas activer les CPs (Fig.R15). Ainsi, les résultats montrent que la concentration de L-Glu optimale de stimulation est 20 mM, c'est la raison pour laquelle cette concentration a

été utilisée pour tester tous les 20 L-AAAs. De plus, la réponse des CPs à 20 mM est la plus importante chez les individus âgés de 3 jours. Nous avons donc décidé de tester des individus âgés de 3 jours avec 20 mM des différents L-AAAs

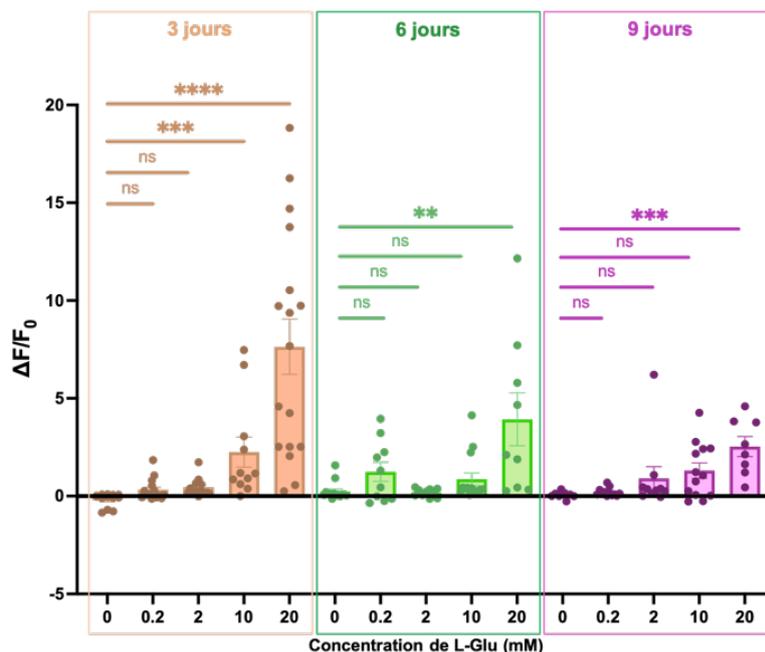


Fig. R15 : Activation des CPs par le glutamate (L-Glu).

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs en présence de différentes concentrations de L-Glu : 0 ; 0,2 ; 2 ; 10 et 20 mM, et de différents âges : 3 jours en orange, 6 jours en vert et 9 jours en rose. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm \text{SEM}$ des lobes des CPs de cerveaux $mnd^{24-1}-Gal4>UAS-GCaMP6s$. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés pour chaque âge entre les différentes concentrations de L-Glu testées. ns : non significatif ; * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$. $n=8$ à 17 lobes.

Ainsi, nous avons testé les 20 L-AAAs sur les CPs pour déterminer si les CPs étaient capables d'être activés par d'autres L-AAAs et déterminer leur nature (Fig.R16).

L'activité calcique des lobes des CPs des cerveaux témoins $mnd^{24-1}-Gal4>UAS-GCaMP6s$ + Ringer ($\Delta F/F_0 = -0,22 \pm 0,10$) est comparée à l'activité des lobes des CPs des cerveaux $mnd^{24-1}-Gal4>UAS-GCaMP6s$ après application de 20 mM d'un L-AA spécifique. Les moyennes \pm SEM des pics d'intensité de fluorescence pour chaque L-AAAs sont représentées dans la Fig.R16. Les résultats montrent que les CPs sont activés, directement ou indirectement, de manière significative, par tous les L-AAAs exceptés la L-Ser ($\Delta F/F_0 = 0,27 \pm 0,13$) et le L-Trp ($\Delta F/F_0 = 0,31 \pm 0,15$). Les résultats montrent que le L-Asp, L-Glu, L-His, L-Lys, L-Thr, L-Tyr et L-Val semblent être les L-AAAs induisant

les réponses calciques des CPs les plus intenses et significatives. Le L-Glu est le L-AAs parmi tous les L-AAs qui semble activer le plus fortement les CPs ($\Delta F/F_0 = 6,46 \pm 1,06$).

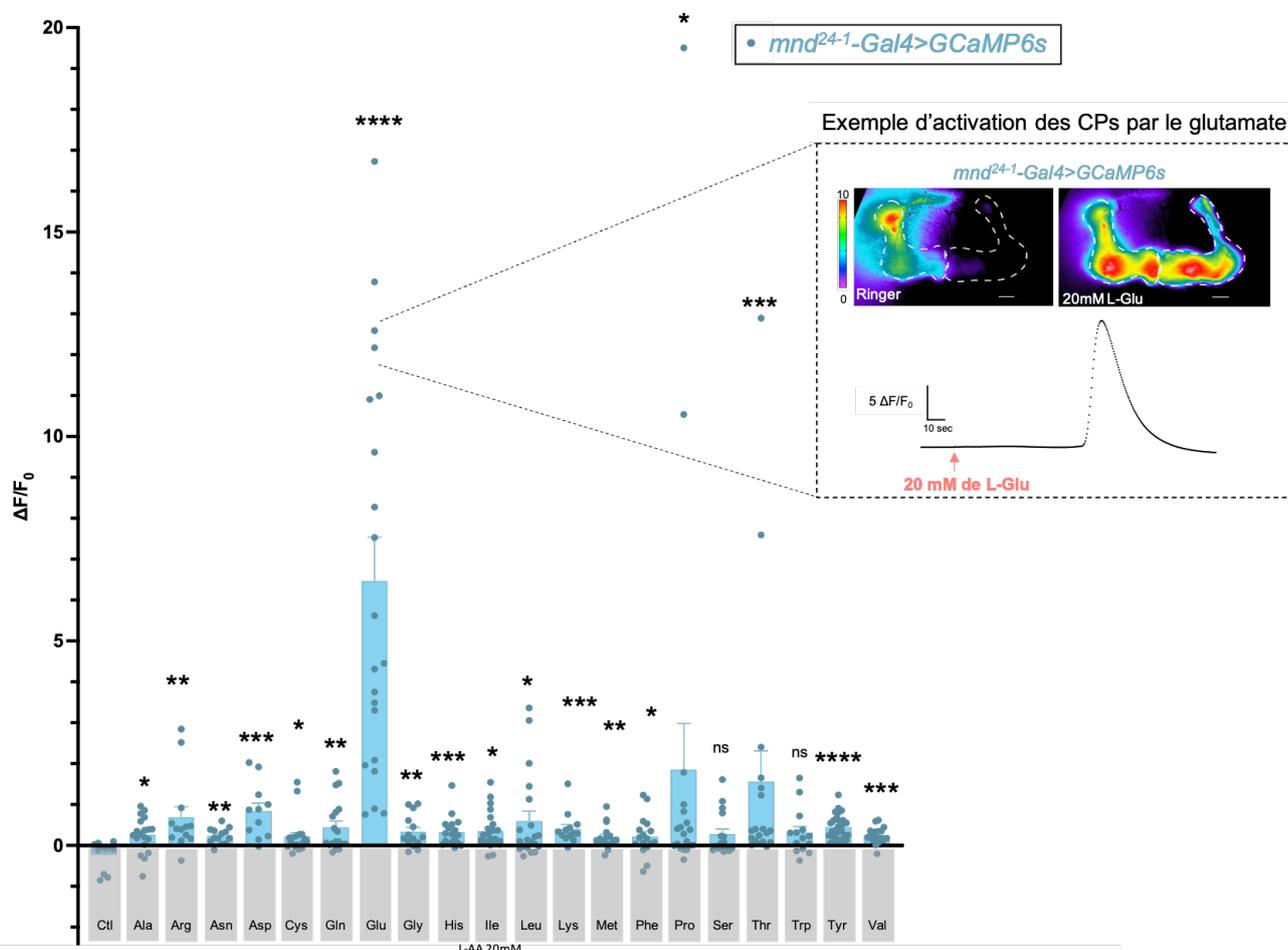


Fig. R16 : Activation des CPs par les L-AAs.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs en présence de 20 mM d'un L-AA donné. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm SEM$ des lobes des CPs de cerveaux $mnd^{24-1-Gal4>UAS-GCaMP6s}$. Chaque point représente une donnée individuelle. Tous les L-AAs activent les CPs, exceptés la L-Ser et le L-Trp. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin (Ringer) et la condition L-AA. ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$. $n = 11$ à 27 lobes. L'encadré en pointillés montre un exemple d'activation des CPs en réponse à 20 mM de L-Glu : les images en fausses couleurs avant et après application de glutamate, ainsi que la courbe de variation de fluorescence ($\Delta F/F_0$) dans le temps.

Pour déterminer si MND joue un rôle dans la régulation de l'activité des cellules des KCs en réponse aux L-AAs, nous avons dérégulé *mnd* spécifiquement dans les $KC\alpha/\beta$ dans les cerveaux $mnd^{24-1-Gal4>UAS-GCaMP6s;UAS-mnd^{dsRNAkk}$ (Fig.R17).

Dans cette condition, nous observons que la réponse à certains acides aminés n'est pas modifiée, même en dérégulant *mnd* dans les CPs, c'est le cas pour les réponses à la L-Valine ($\Delta F/F_0 = 0,24 \pm 0,04$ vs $\Delta F/F_0 = 0,26 \pm 0,08$) et à la L-Tyrosine ($\Delta F/F_0 = 0,45 \pm 0,05$ vs $\Delta F/F_0 = 0,41 \pm 0,16$) par exemple. Ces résultats montrent que les KCs sont bien

fonctionnelles malgré la dérégulation de *mnd* dans les CPs. De plus, l'anatomie des CPs n'apparaît pas modifiée en dérégulant *mnd*, suggérant que *mnd* n'a pas d'incidence drastique sur le développement des CPs. Une abolition de la réponse calcique induite par sept L-AAs : L-Arg, L-Asp, L-Leu, L-Ile, L-Lys, L-Glu, et L-Thr, est observée en dérégulant *mnd* dans les KCs. Ce qui suggère que MND est nécessaire à l'activité neuronale des KCa/β en réponse à de ces sept acides aminés (Fig.R17).

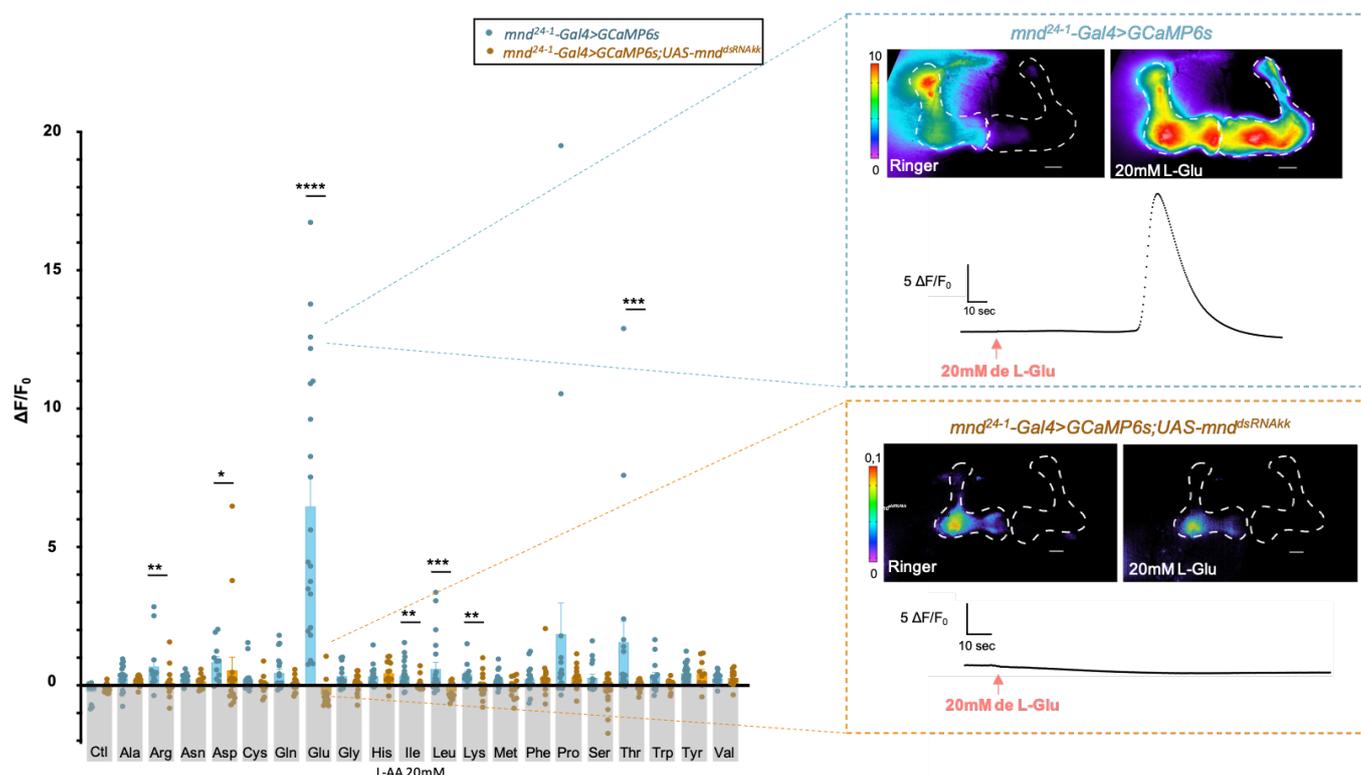


Fig. R17 : MND est nécessaire à l'activation des KCa/β en réponse à certains L-AAs.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs en présence de 20 mM d'un L-AA donné. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm SEM$ des lobes de cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s (Données bleues) et *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNakk} (Données orange). Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour un AA donné, entre la condition témoin (*mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s) et la condition où *mnd* est dérégulé (*mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNakk}). Tous les résultats statistiquement différents entre les deux conditions ont été annotés : * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$ sinon ils ne sont pas significatifs (aucun *). $n = 10$ à 16 lobes. L'encadré en pointillés montre un exemple d'activation des CPs en réponse à 20 mM de L-Glu : les images en fausses couleurs avant et après application de glutamate, ainsi que la courbe de variation de fluorescence ($\Delta F/F_0$) dans le temps, en bleu pour un cerveau *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s et orange pour un cerveau *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNakk}.

Il est à noter que la L-Leu et la L-Ile stimulent l'activité des lobes des CPs ($\Delta F/F_0 = 0,59 \pm 0,23$; $\Delta F/F_0 = 0,34 \pm 0,09$ respectivement) et que cette activité est abolie lorsque *mnd* est dérégulé dans les CPs ($\Delta F/F_0 = -0,22 \pm 0,07$; $\Delta F/F_0 = 0,06 \pm 0,06$ respectivement) (Fig.R17). Ces résultats sont similaires et cohérents à ceux obtenus lors

de la dérégulation de *mnd* dans les IPCs larvaires en réponse à ces mêmes acides aminés (Manière *et al.*, 2016). Ainsi, nos résultats semblent confirmer le fait que MND est bien un transporteur de L-Leu *ex vivo*, ce qui avait été montré en culture cellulaire S2 (Reynolds *et al.*, 2009).

En conclusion, ces résultats montrent que l'activité des KC α / β est modulée par la présence de L-AAAs et que cette augmentation d'activité des CPs pour sept L-AAAs est dépendante de la présence de MND.

Dans les IPCs larvaires, la L-Leu active une voie de signalisation dépendante de la GDH afin de permettre la libération de DILPs et cette voie intracellulaire apparaît être indépendante de TOR (Manière *et al.*, 2016). Nous avons donc recherché à savoir si la L-Leu activait les CPs par une voie intracellulaire GDH et/ou une voie TOR. Pour tester l'implication potentielle de ces deux voies, des expériences d'imagerie calcique ont été réalisées (Fig.R18).

Dans un premier temps, 20 mM de L-Leu ont été appliqués sur des cerveaux témoins (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*UAS-GCaMP6s*). En réponse, les KC α / β voient leur activité fortement augmentée ($\Delta F/F_0 = 0,49 \pm 0,11$) (Fig.R18), comme nous l'avions observé précédemment (Fig.R17). Quand *gdh* est dérégulée (cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*UAS-GCaMP6s*; *UAS-gdh*^{dsRNAkk}), l'activité des KC α / β reste inchangée comparée aux cerveaux témoins ($\Delta F/F_0 = 0,44 \pm 0,08$), ce qui suggère que la voie intracellulaire GDH n'est pas impliquée dans la voie intracellulaire d'activation des KC α / β induite par la L-Leu. *A contrario*, l'inactivation de la voie TOR dans les KC α / β soit par ARNi (cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*UAS-GCaMP6s*; *UAS-Tor*^{dsRNAkk}) soit par expression d'une forme dominante négative de TOR (cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4*>*UAS-GCaMP6s*; *UAS-Tor*^{TED}) abolit la réponse calcique des KC α / β à la L-Leu ($\Delta F/F_0 = 0,001 \pm 0,07$; $\Delta F/F_0 = 0,066 \pm 0,06$) (Fig.R18).

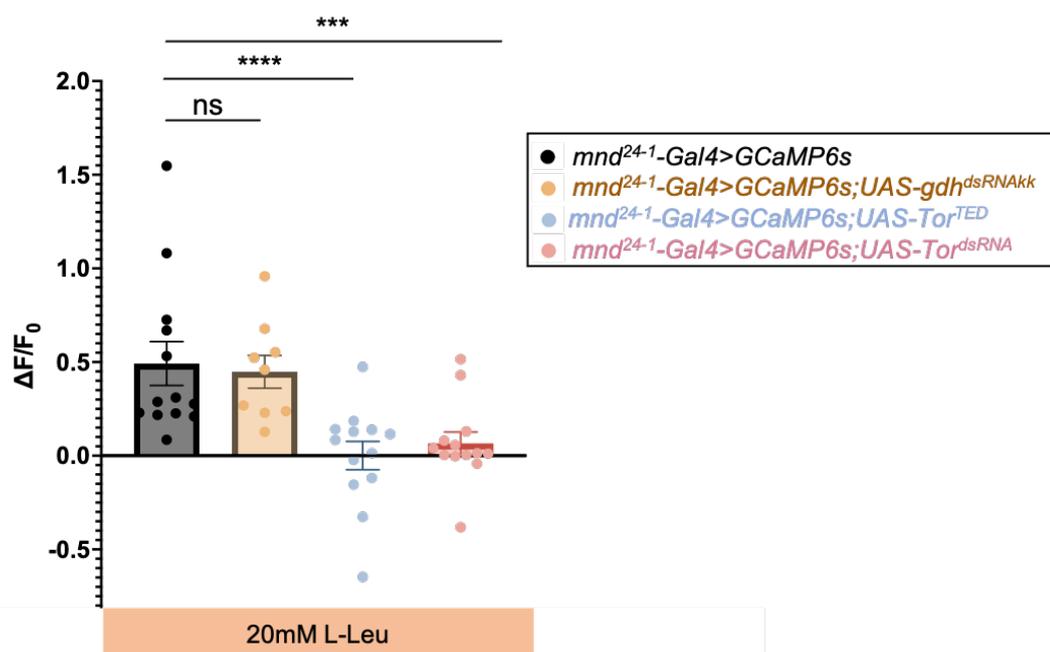


Fig. R18 : La Leucine active les KC α/β par une voie TOR dépendante.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs en présence de 20 mM de L-Leu des CPs de cerveaux mnd^{241} -Gal4>UAS-GCaMP6s (en noir) ; des cerveaux mnd^{241} -Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-gdh^{dsRNAkk} (jaune) ; des cerveaux mnd^{241} -Gal4<UAS-GCaMP6s ;UAS-Tor^{TED} (bleu) ; ou des cerveaux mnd^{241} -Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-Tor^{dsRNA} (rose). L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0$, \pm SEM des lobes des CPs pour chaque condition. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney sont faits entre la condition témoin (mnd^{241} -Gal4<UAS-GCaMP6s) et les conditions de dérégulation de gdh ou Tor. ns : non significatif ; *** : $p < 0.001$; **** : $p < 0.0001$. $n = 9$ à 13

Contrairement aux résultats obtenus chez la larve où la voie GDH est primordiale dans l'activation des IPCs (Manière *et al.*, 2016), ici la stimulation des KC α/β par la leucine passe par une voie intracellulaire TOR dépendante et non GDH. Ces résultats montrent que la leucine peut activer différentes voies intracellulaires suivant les cellules considérées et qui ont sûrement des finalités différentes sur la physiologie des cellules.

4. MND et les comportements gouvernés par les CPs

Comme expliqué en introduction, les CPs sont des structures neurales intégratives de multiples signaux sensoriels (olfactifs, gustatifs, visuels et thermiques) qui interviennent dans un grand nombre de comportements innés et acquis. J'ai montré dans la première partie de ma thèse que la protéine MND est présente au niveau de la membrane plasmique et du RE des corps cellulaires des KCs. MND ne semble pas être présente au niveau des lobes, régions de connexions synaptiques entre les KCs>MBONs et les KCs>DANs, suggérant que MND n'interviendrait pas directement dans la régulation synaptique de cette zone de sortie (output) des KCs. De plus, les expériences d'imagerie calcique montrent que MND joue un rôle important dans l'activité des CPs en réponse à certains AAs (L-Arg, L-Asp, L-Glu, L-Leu, L-Ile, L-Lys et L-Thr). Ce qui suggère que MND est nécessaire au bon fonctionnement des neurones des CPs. Ainsi, cette chaîne légère de transporteur d'acides aminés pourrait être potentiellement requise dans la régulation de certains comportements contrôlés par les CPs. C'est pour répondre à cette question qu'il a été entrepris différents tests comportementaux en dérégulant l'expression de MND par ARNi dans les KCs (*mnd^{24-1-Gal4}>UAS-mnd^{dsRNA}*) qui expriment *mnd* sous la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹*. Mégane Simonnet, doctorante qui a initié le travail de recherche sur *mnd* chez l'adulte, s'est intéressée à la potentielle implication de MND dans le contrôle de l'activité locomotrice et dans la perception olfactive. Ses études n'ont pas permis de mettre en évidence une fonction claire et spécifique de MND au sein des CPs dans ces comportements (Simonnet, 2015). Je me suis donc intéressée à deux autres comportements dont une partie de la régulation est médiée par les CPs : l'agressivité (Zwarts *et al.*, 2011 ; Chouhan *et al.*, 2017) et l'attraction sociale (Sun *et al.*, 2020).

A. Calibration des tests de comportement d'agressivité

Afin d'étudier le rôle potentiel de MND dans le comportement d'agressivité, j'ai choisi d'utiliser un driver spécifique de tous les lobes des CPs. Nous avons choisi *VT30559-Gal4* car il est spécifique des CPs et est utilisé chez l'adulte pour l'étude du rôle des CPs dans la mémoire notamment (Plaçais *et al.*, 2017). L'utilisation de *VT30559-Gal4* permettra d'induire le ARNi ciblant *mnd* dans tous les neurones des CPs. J'ai donc dans un premier temps vérifié que *VT30559-Gal4* ne s'exprime que dans les neurones des CPs à l'aide du rapporteur mCD8 ::GFP. Le profil d'expression de

VT30559-Gal4 semble restreint uniquement aux neurones des CPs dans le cerveau adulte (Fig.R19A).

Afin d'éviter tout biais dû au fond génétique, j'ai isogénéisé les lignées VT30559-Gal4 et UAS-mnd^{dsRNAkk} puis croisé ces deux lignées pour obtenir des individus dont mnd est dérégulé dans toutes les KCs. J'ai ensuite pu quantifier le comportement d'agressivité des différentes lignées témoins et d'intérêt.

Premièrement, j'ai vérifié que les individus entretenus dans deux étuves différentes, une où le cycle jour/nuit est réglé sur 8h-20h et une deuxième réglée sur 9h-21h, présentent un comportement d'agressivité similaire. J'ai quantifié le nombre de lunges (menaces physiques) que se donnent les mâles entre eux. J'ai comparé les moyennes du nombre de lunges de chaque génotype en fonction de l'étuve dans laquelle les individus ont été élevés. Pour chaque génotype, aucune différence statistique n'a été établie (Fig.R19B), ce qui suggère que le choix de l'étuve dans laquelle les individus sont élevés n'influence pas leur agressivité. Ainsi, les résultats obtenus avec les individus issus des deux étuves peuvent être regroupés et analysés ensemble.

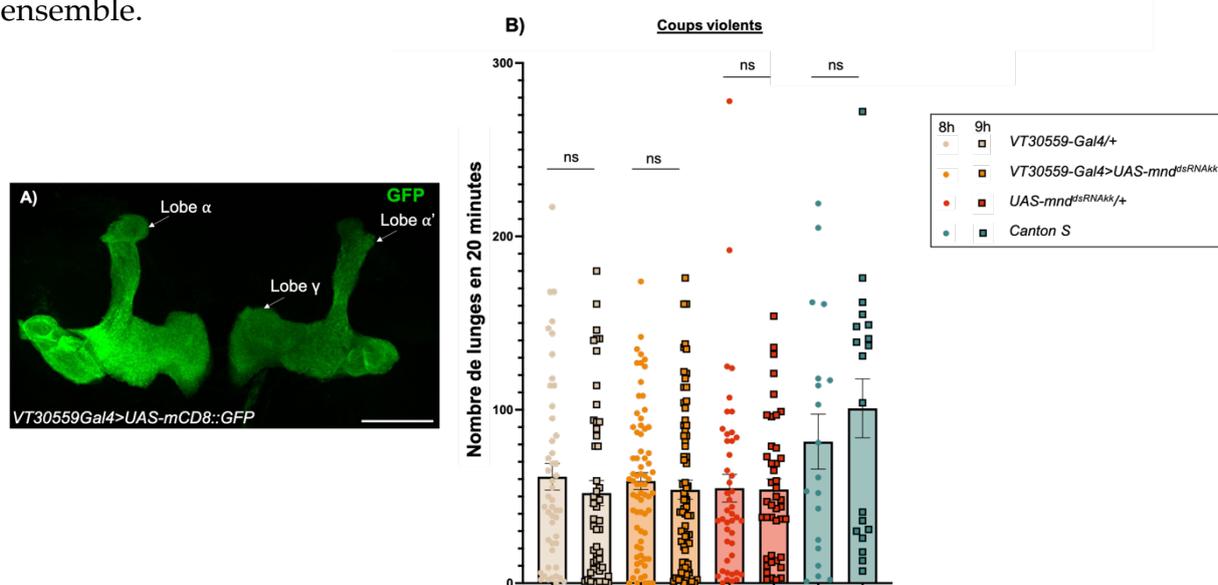


Fig. R19 : L'environnement d'élevage n'impacte pas le comportement d'agressivité
 A) Z projection représentative du profil d'expression de VT30559-Gal4 dans les CPs (VT30559-Gal4>UAS-mCD8::GFP). Le signal GFP est amplifié par un marquage α -GFP. La barre d'échelle représente 20 μ m. B) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes des individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=48 et n=50), UAS-mnd^{dsRNAkk}/+ (rouge ; n=45 et n=44) et Canton S (bleu ; n=19 et n=19) et des individus dont mnd a été dérégulé dans les CPs VT30559-Gal4>UAS-mnd^{dsRNAkk} (jaune ; n=48 et n=50). Les histogrammes montrent la moyenne \pm SEM. Chaque point ou carré représente une donnée individuelle pour les individus de l'étuve 8h, et l'étuve 9h, respectivement. Des tests de Mann-Whitney sont faits entre la condition 8h et 9h d'un même génotype.

B. Le comportement d'agressivité

Après compilation des tests d'agressivité, j'ai comparé les différents indices de l'agressivité entre les différentes lignées. Le nombre de lunges mesurés pour les individus présents sur la nourriture ne semble pas être modulé par la dérégulation de *mnd* dans les CPs (Fig.R20). Les individus *VT30599-Gal4>UAS-mnd^{dsRNAkk}* font en moyenne $53,67 \pm 3,59$ coups violents (lunges) en 20 minutes. Les lignées parentes *VT30599-Gal4/+* et *UAS-mnd^{dsRNAkk}/+* montrent des moyennes de $56,58 \pm 5,27$ et $54,41 \pm 5,02$ de lunges en 20 minutes, respectivement. Ces moyennes ne sont statistiquement pas différentes les unes des autres (Fig.R20A). De plus, le nombre de lunges en 10 minutes (Indice de vigueur d'agressivité) ne montre pas non plus de différence entre les génotypes (Fig.R20B). Ces résultats suggèrent que MND n'a pas de fonction essentielle dans l'ensemble des KCs dans le comportement d'agressivité territorial contrôlé par les corps pédonculés. De même, le nombre de menaces visuelles (threats), ne semble pas varier avec la diminution de MND dans tous les CPs (Fig.R21B). Ainsi, l'utilisation de menace visuelle comme stratégie d'agression ne semble pas impliquer la présence de MND dans les CPs. Le temps de latence qui correspond au temps que prennent les individus à générer le premier lunge est compris entre 3,5 et 4,3 minutes pour les différents génotypes (Fig.R21A). Ces temps ne sont pas significativement différents entre les lignées.

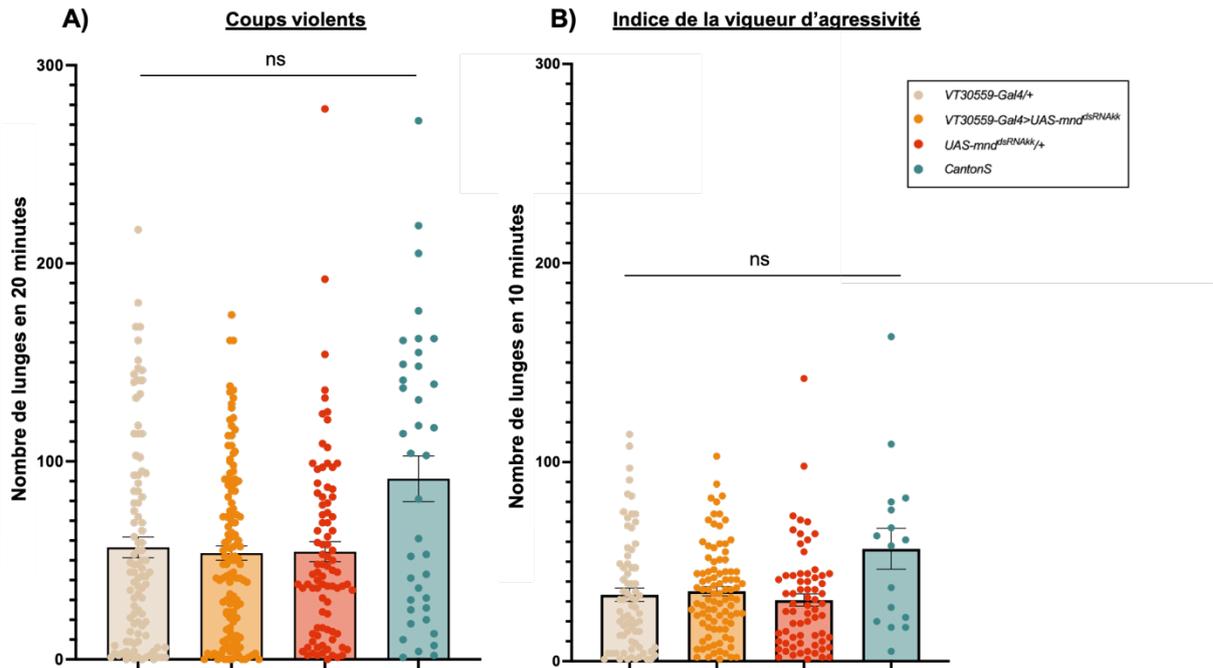


Fig. R20 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs n'impacte pas le comportement d'agressivité (1).

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) l'indice de vigueur d'agressivité (le nombre de lunges comptabilisés sur 10 minutes après le premier lunge) des individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=98), UAS-*mnd*^{dsRNA}/+ (rouge ; n=89) et Canton S (bleu ; n=38), ainsi que des individus dont *mnd* a été dérégulé dans les CPs (VT30559-Gal4>UAS-*mnd*^{dsRNA} (jaune ; n=135)). Les histogrammes montrent la moyenne ± SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés sur les différents groupes. ns : non significatif.

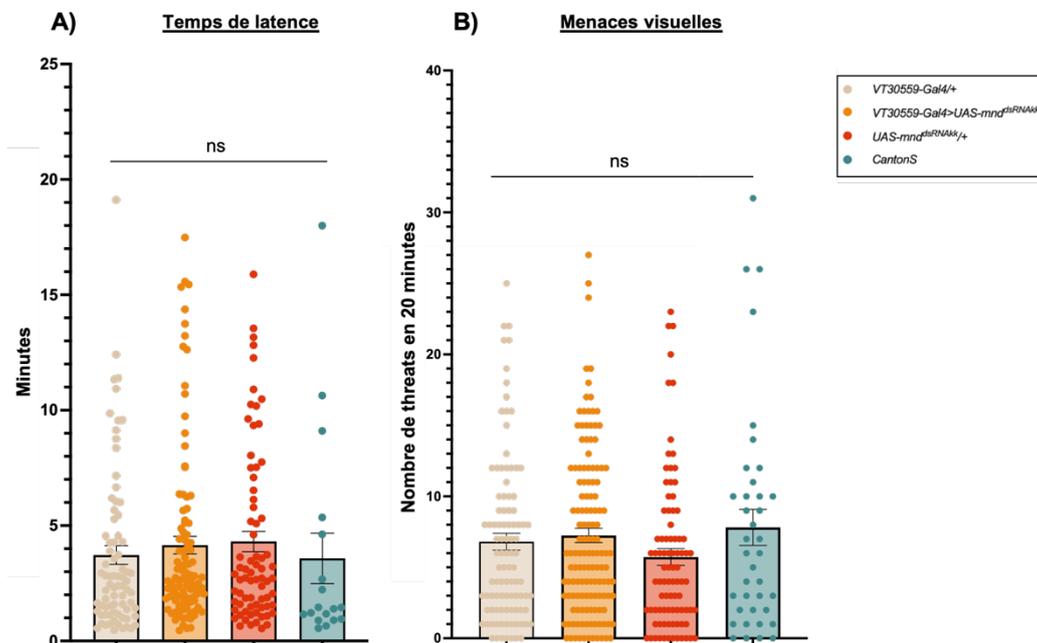


Fig. R21 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs n'impacte pas le comportement d'agressivité (2).

A) Le temps de latence en minutes. B) le nombre de threats comptabilisé en 20 minutes des individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=98), UAS-*mnd*^{dsRNA}/+ (rouge ; n=89) et Canton S (bleu ; n=38), ainsi que des individus dont *mnd* a été dérégulé dans les CPs (VT30559-Gal4>UAS-*mnd*^{dsRNA} (jaune ; n=135)). Les

histogrammes montrent la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif

Un autre indice peut être quantifié lors de ces tests d'agressivité, notamment un indice de la parade sexuelle en quantifiant le chant alaire (vibrations des ailes sur le côté de l'animal) (Fig.R22). Comme pour tous les indices de l'agressivité, l'indice de parade sexuelle ne semble pas être modifié par la diminution de MND dans le CPs.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la balance dynamique des comportements de parade et d'agressivité ne semblent pas dépendre de la régulation de l'activité des CPs par MND.

Étant donné que nous utilisons une lignée ARNikk de VDRC, il est possible de potentialiser l'action du ARNi par Dicer2. Même si l'efficacité du ARNi ciblant *mnd* est visible en RT-qPCR et en imagerie calcique sans potentialisation de Dicer2, j'ai voulu être sûre que l'absence de phénotype comportemental observée ne soit pas dû à une faiblesse d'action du ARNi. J'ai refait les tests d'agressivité avec des individus *VT30599-Gal4>UAS-mnd^{dsRNAkk}*, *Dicer2*. L'analyse des différents paramètres de l'agressivité montre que l'agressivité des individus exprimant *Dicer2* n'est statistiquement pas différente des individus *VT30599-Gal4>UAS-mnd^{dsRNAkk}*. Ainsi, même en potentialisant l'effet du ARNi, aucune différence d'agressivité n'a été observée (Fig. R23).

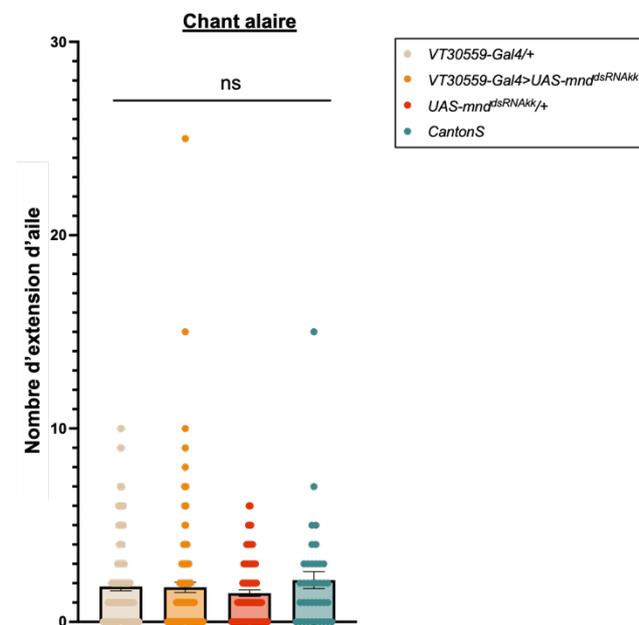


Fig. R22 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs n'impacte pas le comportement de parade sexuelle.

Histogramme montrant la moyenne \pm SEM d'extensions d'aile des individus *VT30559-Gal4/+* (blanc), *VT30559-Gal4>UAS-mnd^{dsRNAkk}* (jaune), *UAS-mnd^{dsRNAkk}/+* (rouge) et *Canton S* (bleu). Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés sur les différents génotypes. ns : non significatif.

Ces études semblent montrer que MND dans les CPs n'est pas requis pour l'initiation d'un combat territorial en présence de nourriture, pour moduler l'intensité du combat ou changer de stratégies d'agression. Cependant, comme les différents compartiments des CPs peuvent avoir des effets antagonistes (Owald *et al.*, 2015 ; Sun

et al., 2018), il est possible que MND puisse intervenir dans l'activation du comportement d'agressivité dans un lobe A et l'inhibition dans un lobe B, par exemple. Cela pourrait expliquer pourquoi le fait de déréguler *mnd* dans tous les lobes simultanément ne permette pas de conclure sur le potentiel rôle de MND dans le comportement d'agressivité dirigé par les CPs.

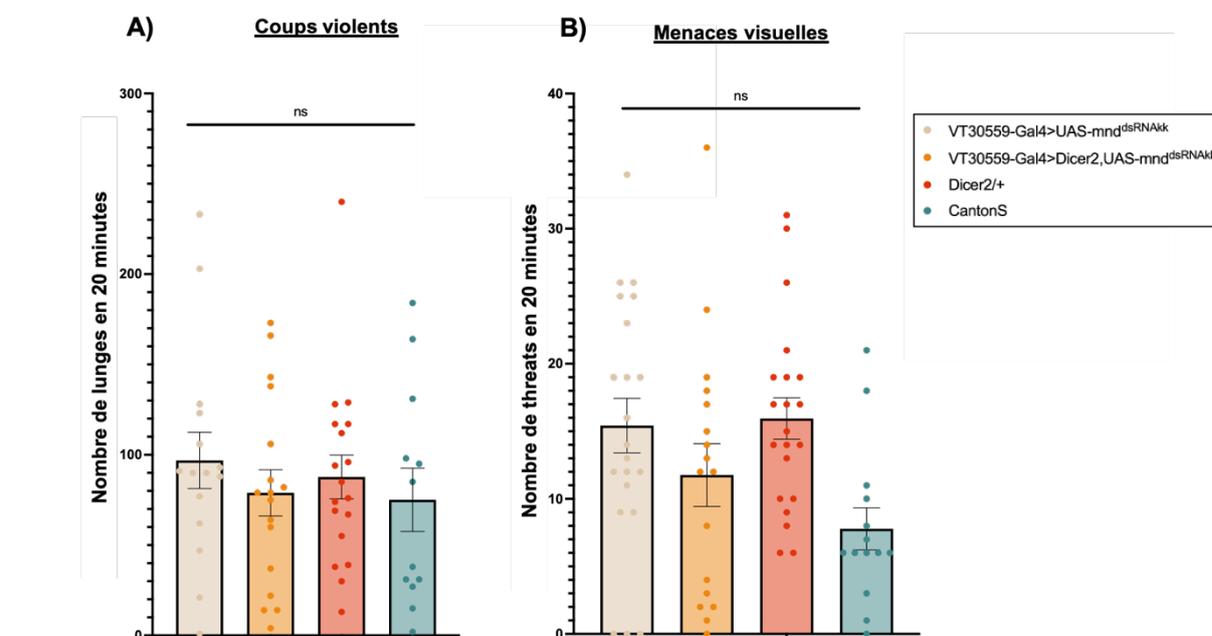


Fig. R23 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs potentialisé par Dicer2 n'impacte pas significativement le comportement d'agressivité.

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) Le nombre de threats des individus témoins VT30559-Gal4>UAS-*mnd*^{dsRNAkk} (blanc, $n=15$), Dicer2 (rouge, $n=18$) et Canton S (bleu, $n=12$) ainsi que des individus dont *mnd* a été dérégulé dans les CPs (VT30559-Gal4>Dicer2;UAS-*mnd*^{dsRNAkk} (jaune, $n=16$). Les histogrammes montrent la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif.

Pour faire les tests d'agressivité, les individus sont élevés en isolement social, ce qui permet d'exacerber le comportement d'agressivité et ainsi le quantifier facilement (Hoffmann, 1990). En effet, l'impact de l'isolement social sur l'agressivité est bien connu chez les mammifères (Matsumoto *et al.*, 2005 ; Takahashi, 2022) comme chez la drosophile (Vora *et al.*, 2022 ; Liu *et al.*, 2011).

Je me suis alors demandé si MND pouvait intervenir dans cette modulation sociale de l'agressivité. J'ai entrepris de faire des tests d'agressivité avec des mâles groupés ensemble par 6. J'ai analysé les mêmes paramètres que précédemment.

Les individus groupés présentent un niveau significativement plus faible d'agressivité comparés aux individus isolés de même génotype excepté pour VT30559-

Gal4/+ (Fig.R24). Ces résultats sont cohérents avec l'impact de l'isolement social sur le comportement d'agressivité (Liu *et al.*, 2011). De manière étonnante, il n'y a pas de différence significative d'agressivité entre des mâles *VT30559-Gal4/+* isolés et groupés, ce qui suggère que ce driver à lui seul, sans être accompagné d'un *UAS*, semble avoir un impact sur la modulation de l'agressivité par l'environnement social.

Quand on compare les individus groupés en fonction de leur génotype, les indices d'agressivité ne sont statistiquement pas différents (Fig.R24). Ce qui suggère que *MND* n'interviendrait pas dans l'intégration, l'interprétation, la mémorisation des facteurs environnementaux sociaux comme les phéromones intervenant dans la modulation de l'agressivité territoriale. Ces résultats sont préliminaires et nécessiteraient d'être répétés et confirmés.

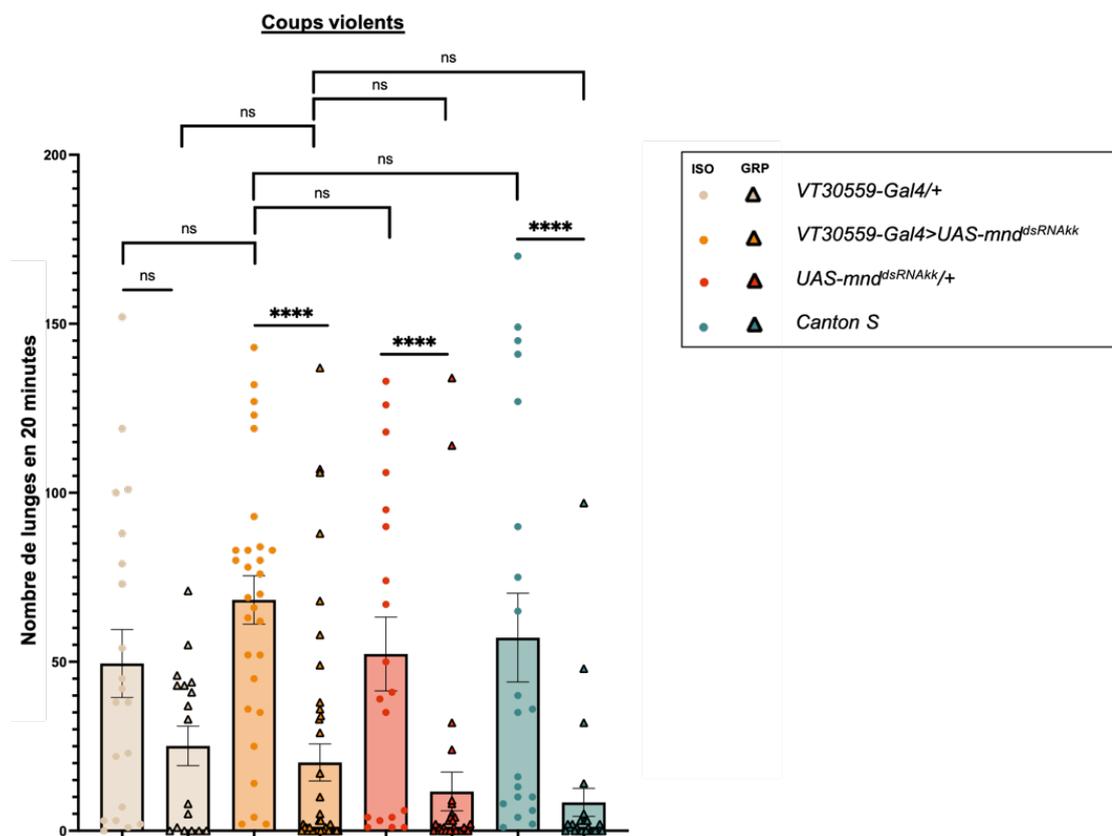


Fig. R24 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs n'intervient pas dans la modulation sociale du comportement d'agressivité.

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes, des individus *VT30559-Gal4/+* (blanc, isolés $n=20$; groupés $n=18$), *VT30559-Gal4>UAS-mnd^{dsRNA}kk* (jaune, isolés $n=29$; groupés $n=41$), *UAS-mnd^{dsRNA}kk/+* (rouge, isolés $n=19$; groupés $n=31$) et *Canton S* (bleu, isolés $n=20$; groupés $n=26$). Les histogrammes montrent la moyenne \pm SEM. Chaque point ou triangle représente une donnée individuelle pour les individus élevés en isolement, et les individus élevés en groupe, respectivement. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition « isolé » et « groupés » d'un même génotype. Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés entre les génotypes de la conditions « isolé » et entre les génotypes de la condition « groupés ». ns : non significatif, **** : $p < 0,0001$.

C. L'espace social

Comme les CPs sont également impliqués dans la régulation l'attraction sociale (Sun *et al.*, 2020), je me suis intéressée au placement des drosophiles dans un espace confiné lors d'une dérégulation de *mnd* au sein des CPs. Le paramètre que j'ai analysé est le nombre de drosophiles se plaçant à proximité d'une autre drosophile (dans un rayon équivalent à quatre fois la longueur d'un corps de drosophile). Plus ce nombre est élevé, plus les drosophiles se placent proches les unes des autres, montrant alors un défaut de perception des congénères (Simon *et al.*, 2012). Lors d'une dérégulation de *mnd* dans les CPs, aucune différence n'a pu être mise en évidence sur ce paramètre, suggérant que MND dans les CPs n'intervient pas dans le placement des individus dans un groupe et donc dans l'attraction sociale (Fig.R25C).

Cette étude préliminaire ne semble pas montrer d'implication de MND dans cette régulation. Des réplicats restent à faire pour permettre de confirmer ou d'invalider cette conclusion.

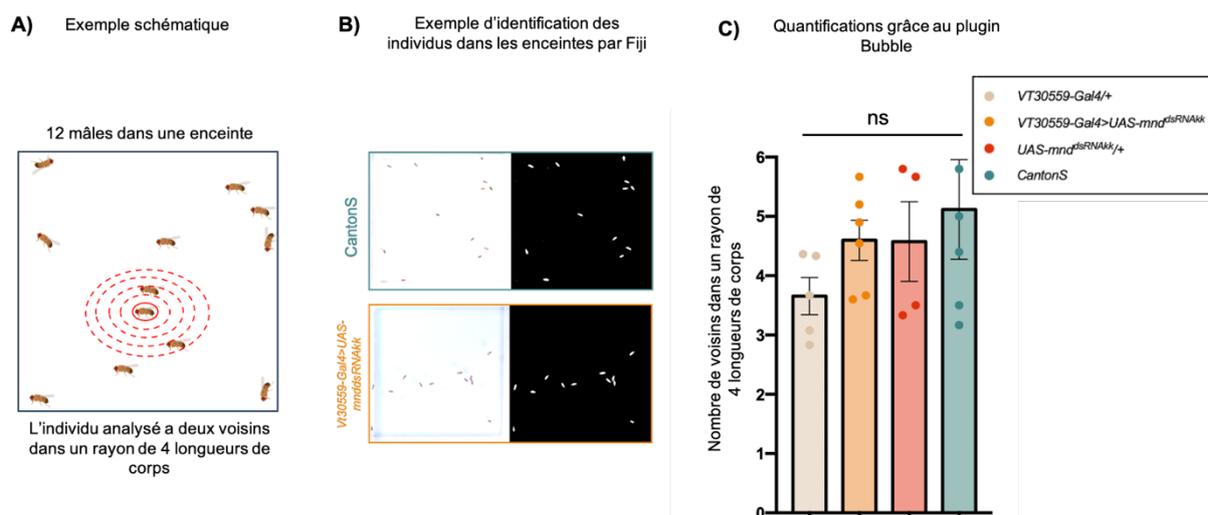


Fig. R25 : L'inhibition de *mnd* dans les CPs ne semble pas modifier le placement des mâles dans un groupe.

A) Schéma montrant le principe de quantification du nombre de voisins dans un rayon de quatre longueurs de corps. B) Exemple d'enceintes (fond blanc) avec 12 individus cantons S (encadré en bleu), ou VT30559-Gal4>UAS-mnd^{dsRNA}/+ (encadré orange), et l'identification automatique des individus par Fiji avec le plugin Bubble (Yost *et al.*, 2020). C) Histogramme montrant la moyenne ± SEM du nombre de voisins dans un rayon de quatre longueurs de corps, des individus VT30559-Gal4/+ (blanc, 5 enceintes de 12 individus), VT30559-Gal4>UAS-mnd^{dsRNA}/+ (jaune, 6 enceintes de 12 individus), UAS-mnd^{dsRNA}/+ (rouge, 4 enceintes de 12 individus) et Canton S (bleu, 5 enceintes de 12 individus). Chaque point représente une donnée individuelle *p*. Un test de Kruskal-Wallis est fait entre les génotypes. ns : non significatif.

Conclusions et discussions (partie 1)

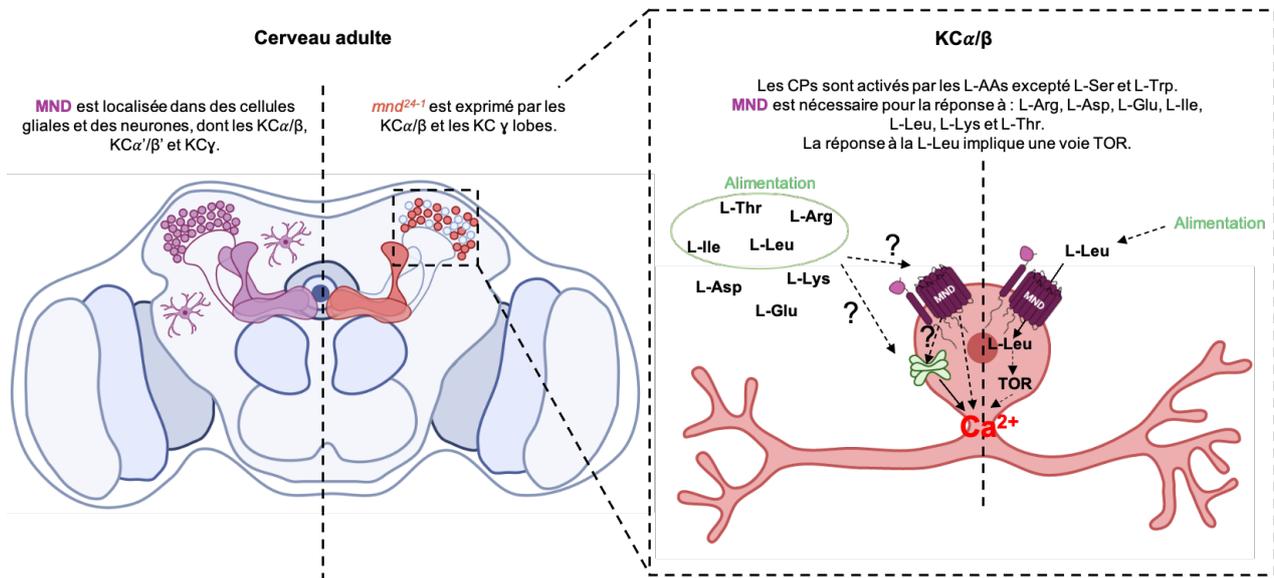


Fig. R26 : Schéma simplifié de la détection des L-AA par les CPs grâce à MND.

Ainsi, MND, un transporteur d'AA de type LAT, est présent dans le cerveau de la drosophile adulte. Nos données révèlent l'expression de *mnd-RA* et *mnd-RC* dans les corps et têtes de drosophiles, tandis que le troisième transcrypt prédit *mnd-RD* n'a pas pu être détecté. Ce qui indique soit son absence, soit un niveau d'expression trop faible pour être détectée en RT-PCR. En examinant la région régulatrice du promoteur de *mnd*, nous montrons que deux séquences régulatrices spécifiques dirigent l'expression dans deux types de cellules différentes du cerveau adulte. *mnd²⁵⁻¹-Gal4* dirige l'expression de MND spécifiquement dans les cellules gliales du cortex. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures montrant que *mnd* est exprimé dans les cellules gliales (Park *et al.*, 2022 ; Li *et al.*, 2023). *A contrario*, nous observons que *mnd²⁴⁻¹-Gal4* est exprimé dans les neurones des CPs. Nos stratégies d'intersections d'expression génétique révèlent que la séquence régulatrice de *mnd²⁴⁻¹* conduit l'expression dans les $KC\alpha/\beta$ et γ mais pas dans les $KC\alpha'/\beta'$ des CPs. Cependant, les immunomarquages de MND montrent sa présence dans les $KC\alpha/\beta$ et γ ainsi que les $KC\alpha'/\beta'$ des CPs. Ces résultats suggèrent que la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹* ne contrôle l'expression de MND que dans un sous-ensemble de KCs et implique l'existence d'une autre séquence régulatrice neuronale de MND.

Les outils utilisés (*mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA*) ont été générés par clonage des séquences régulatrices putatives de *mnd* et insérées à un locus ectopique (*attP2*). Il est donc possible que ces séquences ne présentent pas tous les sites de fixation de tous les facteurs de transcription qui régulent l'expression de *mnd*. Il est possible que des activateurs ou inhibiteurs de l'expression de *mnd* ne puissent pas jouer leur rôle sur les outils génétiques *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA*. De ce fait, il est possible que nous observions l'expression de la GFP, reflétant l'expression de *mnd²⁴⁻¹*, dans des structures qui n'expriment normalement pas la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹*. Ce qui pourrait expliquer pourquoi nous observons de la GFP dans le corps ellipsoïde sans pour autant avoir un marquage de la protéine MND dans ces cellules. Ces mêmes différences ont également été observées par Deng et collaborateurs (2019) avec des drivers utilisant le locus endogène du gène cible.

L'intersection génétique de nos deux drivers *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA* suggère que *mnd* n'est potentiellement pas exprimé dans les *KC α / β core* sous cette séquence régulatrice. Le profil d'expression de *mnd²⁴⁻¹-Gal4* semble inclure ces neurones, *mnd²⁴⁻¹-LexA* ne semble pas les cibler. Comme ils sont composés de la même séquence régulatrice clonée et insérée au même endroit dans le génome (*attP2*), il est difficile de trancher avec certitude sur l'expression ou non de *mnd²⁴⁻¹* dans ces neurones. Une intersection d'expression avec un driver spécifique des *KC α / β core* serait à envisager afin de répondre à cette question. Les résultats ainsi obtenus pourront nous donner des indications quant à la fonction de MND dans les CPs. En effet, chaque sous-population de KC semble avoir une fonction unique, et les *KC α / β core* semblent être nécessaires au rappel de la mémoire appétitive, mais pas dans le rappel de la mémoire aversive, processus dans lesquels sont impliquées les autres *KC α / β* (Perisse *et al.*, 2013). De plus, il semble que les *KC α / β core* soient nécessaires à la consolidation de la mémoire appétitive et aversive (Huang *et al.*, 2012). Si MND est présent dans les *KC α / β core*, alors MND pourrait intervenir dans ces processus mnésiques.

Les immunomarquages de MND montrent une localisation au niveau du réticulum endoplasmique des KCs, comme cela a été montré dans les IPCs (Manière *et al.*, 2016), suggérant une fonction particulière de MND dans ce compartiment cellulaire. Sachant que des L-AAs peuvent potentiellement être transformés en D-AAs au sein du RE (Jimenez, 2017), il serait intéressant de voir si ce processus est possible chez la drosophile. Si cela est le cas, il est possible que MND puisse intervenir dans le

passage de L-AAAs pour ensuite être modifiés en D-AAAs. Il serait intéressant de déterminer les concentrations de D-AAAs lors d'une dérégulation de MND. De plus, chez les mammifères, les transporteurs LAT1 peuvent être recrutés par LAPT4b au niveau de la membrane lysosomale afin d'activer le complexe mTORC1 (Milkereit *et al.*, 2015). Il est donc envisageable que MND soit également localisée au niveau des lysosomes et est un rôle similaire à LAT1 comme activateur de TOR. Il serait nécessaire de déterminer si MND peut être localisée à la membrane lysosomale dans les KCs.

Nous montrons que l'activation des CPs par 7 L-AAAs est dépendante de MND. Reynolds et collaborateurs (2009) ont montré que MND et JHI-21 interviendrait dans l'import de la leucine dans les cellules S2. Or, l'orthologue mammifère LAT1 de MND est connu pour transporter un plus large éventail de molécules : les larges AAAs neutres, la L-Dopa et les hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Fotiadis *et al.*, 2013). L'identification des différents substrats de MND apporterait des informations cruciales quant au potentiel rôle de MND dans le fonctionnement du SNC et notamment les CPs en réponse aux acides aminés. De plus, il serait également intéressant de déterminer de manière expérimentale si MND est bien l'orthologue de SLC7A5 (LAT1). Les comparaisons de séquences des différentes chaînes légères avec les orthologues humains ne permettent pas d'identifier avec certitude le bon orthologue. Une solution peut être mise en place, le sauvetage de phénotype dans un contexte *mnt²⁴⁻¹-Gal4>UAS-mnt^{dsRNA}* avec un *UAS-slc7A5* (humain) en imagerie calcique fonctionnelle. Ces résultats permettraient de déterminer l'orthologue humain fonctionnel de MND parmi les nombreux orthologues. Une autre stratégie pourrait être d'utiliser un inhibiteur spécifique de LAT1 des mammifères comme JPH203 (Okano *et al.*, 2018 ; Otani *et al.*, 2023) incubé avec des cellules de drosophile exprimant MND et évaluer l'import de leucine en présence de JPH203.

Les EAAs, leucine, l'isoleucine et la thréonine doivent être fournis par l'alimentation et peuvent agir comme des signaux nutritionnels pour réguler l'état d'homéostasie nutritionnelle (Manière *et al.*, 2016 ; Géminard *et al.*, 2009 ; Ki et Lim, 2019). Il est intéressant de noter que les CPs sont un centre intégratif de contrôle du comportement de recherche de nourriture, en effet il reçoit des signaux de faim et de satiété (Tsao *et al.*, 2018). Les DANs régulent l'activité des CPs et contrôlent le comportement olfactif inné. Ces DANs sont sous le contrôle de signaux de satiété tels que les DILPs et l'AstA ou de signaux de faim tels que le NPF, le sNPF et la sérotonine

(Tsao *et al.*, 2018). Nous montrons ici que les $KC\alpha/\beta$ des CPs sont activés par des EAAs tels que leucine, l'isoleucine, la thréonine et que cette activation semble dépendre de MND (Fig.R17). Ainsi, ces EAAs, nutriments provenant de l'intestin, peuvent affecter directement ou indirectement les fonctions neuronales dirigées par les CPs.

La dérégulation de *mnd* dans les $KC\alpha/\beta$ réduit l'activité neuronale en réponse, directe ou indirecte, à certains AAs tels que la leucine et l'isoleucine (Fig.R17). Chez les mammifères, la leucine régule l'activité des neurones POMC hypothalamiques pour contrôler la prise alimentaire (Heeley *et al.*, 2018) par le biais de la signalisation mTOR (Cota *et al.*, 2006). Les neurones POMC expriment le récepteur à la leptine et sont sensibles à cette hormone (hormone de satiété) (Balthasar *et al.*, 2004). De plus, LAT1 est présent dans des neurones hypothalamiques exprimant le récepteur à la leptine et intervient dans la modulation de la sensibilité de ces neurones à la leptine via une voie mTORC1 (Park *et al.*, 2023). Chez la drosophile, les CPs intègrent les signaux de faim et de nourriture pour contrôler le comportement de recherche de nourriture (Tsao *et al.*, 2018). Nous montrons que les CPs sont sensibles à la leucine, ce qui suggère que les CPs intègrent les signaux de satiété des protéines pour ajuster leur activité. Manière et collaborateurs (2016) ont montré que MND est nécessaire à la détection de la leucine dans les IPCs larvaires, ce qui entraîne une augmentation de l'activité neuronale et la libération de DILPs par une voie GDH dépendante (Manière *et al.*, 2016 ; Ziegler *et al.*, 2018). De façon surprenante, dans les CPs adultes, nous montrons que la leucine régule l'activité neuronale par la voie TOR et non par la voie GDH comme décrit dans les IPCs. Il sera intéressant de poursuivre dans cette voie pour démontrer que les CPs via MND joue un rôle dans la prise alimentaire.

D'un point de vue comportementale, MND a fort probablement une fonction dans les comportements contrôlés par les CPs, comme l'activité locomotrice (Serway *et al.*, 2009), la mémoire et l'apprentissage olfactif, l'agressivité (Krashes et Waddell, 2008 ; Chouhan *et al.*, 2017 ; Zwarts *et al.*, 2011). Aucune différence d'activité locomotrice n'a été établie lors de la dérégulation de *mnd* dans $KC\alpha/\beta$ et γ des CPs (*mnd²⁴⁻¹-Gal4*) (Simonnet, 2015). Cependant, il n'est pas à exclure une possible implication de MND dans ce comportement mais plutôt dans les $KC\alpha'/\beta'$ qui sont impliqués dans le réflexe de géotaxie négative (Riemensperger *et al.*, 2013) et dans lesquels nous avons montré la présence de MND (Fig.R11B) dont l'expression n'est pas dirigée par la séquence *mnd²⁴⁻¹* (Fig.R12B). Aussi, il serait intéressant de déréguler

mnd dans ces neurones précisément, avec un driver très spécifique de ces neurones, autre que *c305a-Gal4* qui s'exprime également dans le complexe central, afin de voir si nous observons une différence dans l'activité locomotrice. De même, aucun phénotype comportemental n'a pu être mis en évidence après dérégulation de *mnd* grâce à la séquence régulatrice *mnd²⁴⁻¹-Gal4* au sein des $KC\alpha/\beta$ et γ sur la perception olfactive, la géotaxie négative et la mémoire olfactive aversive (Simonnet, 2015). Il est possible que MND intervienne dans la formation d'autres types de mémoires contrôlés par les CPs (mémoire appétitive, LTM, ARM) (Krashes *et al.*, 2007 ; Krashes et Waddell, 2008 ; Leinwand et Scott, 2021). Il sera intéressant de regarder le rôle de MND dans ces différents types de mémoire ou dans un autre aspect temporel de la mémoire comme la consolidation ou le rappel des souvenirs. Au cours de ma thèse je me suis intéressée au comportement d'agressivité régulé par les CPs (Baier *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2009 ; Zwarts *et al.*, 2011 ; Chouhan *et al.*, 2017). D'après notre étude, le comportement d'agressivité ne semble pas impliquer MND dans tous les CPs ni dans la diminution de l'agressivité médiée par les interactions sociales. Il faudrait étudier la dérégulation de *mnd* uniquement dans les $KC\alpha/\beta$ ou $KC\gamma$ ou $KC\alpha'/\beta'$ et voir si cela modifie le comportement d'agressivité. De plus, MND est requis pour la réponse des KCs au glutamate et il est envisageable que ce neurotransmetteur régule d'autres comportements que ceux étudiés jusqu'alors.

Nos études ont été réalisées grâce à des ARN interférents et non des mutants nuls (KO). L'utilisation de *Dicer2* est conseillée lors de l'utilisation d'ARNi provenant de VDRC notamment les lignées dites « KK » afin de potentialiser l'effet de l'ARNi. Cependant, Aboudhief et collaborateurs (2018) montrent que ce n'est pas toujours le cas suivant les types cellulaires dans lesquels *Dicer2* est exprimé. Ainsi, nous n'avons pas couplé *Dicer2* au ARNikk que nous utilisons. J'ai choisi de l'utiliser lors des tests de comportements d'agressivité afin d'induire au maximum l'effet de l'ARNikk dirigé contre *mnd*. De plus, nous avons induit les ARNi de manière constitutive, impliquant que nos conclusions ne peuvent pas s'affranchir d'une potentielle implication lors du développement. Il faudrait refaire certaines expériences en intégrant *tub-gal80^{ts}* pour être sûr d'une implication fonctionnelle et non développementale. Chez les mammifères, *SLC7A5* semble être indispensable au développement de l'embryon. Un KO général ne permet pas l'émergence d'individus (Ohgaki *et al.*, 2017) et les mutations de *slc7a5* touchant le domaine d'interaction avec CD98 donne le même phénotype de létalité embryonnaire (Tsumura *et al.*, 2003). Le développement des CPs

commence très tôt à l'état embryonnaire et continue jusqu'au stade tardif de la pupaison (Ito et Hotta, 1992). C'est dans les premiers stades pupaux que les CPs sont extrêmement remodelés pour donner naissance à la forme plus complexe des CPs adultes (Lee *et al.*, 1999 ; Truman *et al.*, 2023). D'après les données d'expression de *mnd* lors du développement, c'est au stade pupal qu'il est le moins exprimé, cela peut suggérer qu'il n'intervient pas ou très peu dans le remodelage des CPs. De plus, chez la drosophile des indices laissent supposer que *mnd* n'intervient pas de manière essentielle au développement des CPs. En effet, malgré l'inactivation de *mnd* par les ARNi, l'activité des corps pédonculés en réponse à certains AAs restent inchangée, ceci démontre que les neurones sont bien fonctionnels (Fig.R17).

Ces travaux de recherches font l'objet d'un article en révision favorable dans *Cells* (Cf. « Annexes »).

Partie 2

Introduction

Introduction (2)

La première partie de notre étude montre que MND est impliquée dans la réponse des KCa/β au glutamate (Fig.R17) qui est un AA pouvant jouer le rôle de neurotransmetteur au sein du SNC. MND est classée dans les transporteurs de type LAT (Cf. « Introduction partie 1 ») et transporte en principe des AAs neutres, or le glutamate est un AA chargé négativement, ce qui suggère qu'il ne puisse pas être transporté directement par MND. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux récepteurs au glutamate comme potentiels partenaires de MND au niveau des CPs.

Le glutamate est un AA qui est utilisé directement comme neurotransmetteur au sein du SNC chez les mammifères et chez la drosophile. Il peut provenir de l'alimentation ou être synthétisé par les neurones et les cellules gliales. Lorsqu'un neurone glutamatergique est stimulé, il va libérer par exocytose le glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate va alors se fixer sur des récepteurs au glutamate au niveau postsynaptique et moduler l'activité de ce neurone, transmettant ainsi l'influx nerveux (Fig.II1). Puis, le glutamate au sein de la fente synaptique est recyclé, notamment pas les cellules gliales. Ce cycle glutamate/glutamine est important pour l'homéostasie du glutamate au sein du SNC (Andersen *et al.*, 2021).

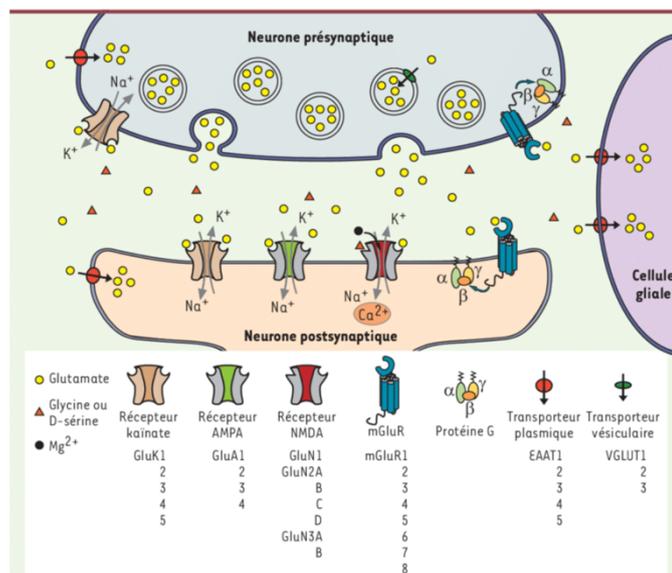


Fig. II1 : Schéma de la synapse glutamatergique.

Le neurone présynaptique (bleu) sécrète du glutamate dans la fente synaptique. Celui-ci va se fixer sur les différents types de récepteurs au glutamate présent au niveau de la membrane du neurone postsynaptique (orange), afin d'activer ce neurone et de transmettre l'influx nerveux. Les quatre types de récepteurs sont présents au niveau

de la membrane postsynaptique : les récepteurs ionotropiques (récepteurs AMPA, récepteurs Kainates (KA), récepteurs NMDA (NMDARs)) et les récepteurs métabotropiques mGluR (couplés à une protéine G). Le glutamate en excès dans la fente synaptique est capté par les cellules gliales (violet) ainsi que les neurones pré et post synaptiques grâce aux transporteurs plasmiques du glutamate de type EAAT. Une fois dans le cytosol, le glutamate peut de nouveau être transporté dans des vésicules de sécrétion grâce aux transporteurs vésiculaires de type VGLUT. D'après Gielen 2010.

1. Les récepteurs au glutamate

Différents groupes de récepteurs au glutamate ont été identifiés. Les récepteurs métabotropique (mGluRs) qui sont des récepteurs couplés à une protéine G. Les récepteurs ionotropiques (iGluRs) qui sont des canaux ioniques. 3 types de récepteurs ionotropiques au glutamate ont été définis chez les mammifères suivant leur spécificité de substrat pharmacologique. Les iGluRs pouvant fixer le glutamate mais également son agoniste le N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) sont appelés récepteurs NMDA (NMDARs). Les iGluRs possédant des affinités pour l'ion kainate sont nommés récepteurs Kainate (KAs). Enfin, les iGluRs sensibles à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique sont les récepteurs AMPAs. Les iGluRs sont perméables aux ions, Ca^{2+} ou K^+ ou Na^+ ou Cl^- , changeant ainsi l'équilibre ionique, permettant la dépolarisation ou l'hyperpolarisation de la membrane du neurone de manière rapide (Traynelis *et al.*, 2010). Les récepteurs métabotropiques au glutamate ne sont pas perméables aux ions, mais permettent la transduction du signal glutamatergique grâce à des messagers secondaires intracellulaires (AMPC, DAG, IP_3), de manière plus lente que les iGluRs.

A. Récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs)

Chez les mammifères, les mGluRs sont divisés en 3 sous-groupes (I, II et III) suivant leur homologie de séquences, le type de second messager utilisé pour la transduction du signal et de leurs propriétés pharmacologiques. Les mGluR du groupe I (mGlu1 et mGlu5) sont couplés à une protéine Gq et permettent la stimulation de la phospholipase C (PLC), ce qui conduit à une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} et une activation de la protéine kinase C (PKC). Pour le groupe II (mGlu2 et mGlu3) et le groupe III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 et mGlu8), les mGluRs sont couplés à une protéine Gi/Go qui va inhiber l'adénylate cyclase (AC) et va conduire à la réduction de la synthèse d'AMPC et ainsi inactiver la protéine kinase A (PKA). Ces deux groupes diffèrent par leur affinité au glutamate et les spécificités des protéines G auxquels ils sont couplés (Gomezà *et al.*, 1996 ; Parmentier *et al.*, 1998). Les mGluRs jouent des rôles

essentiels dans la régulation des propriétés excitatrices et de désensibilisation (Suh *et al.*, 2018).

Chez la drosophile, un unique représentant des récepteurs métabotropiques au glutamate a été identifié par Parmentier et collaborateurs (1996) et est apparenté aux mGluRs du groupe II des mammifères (Parmentier *et al.*, 2000). mGluR est présent à la membrane des neurones de la JNM (Bogdanik *et al.*, 2014). La signalisation mGluR est impliquée dans la régulation des propriétés d'excitabilité présynaptique importantes pour le contrôle de la réponse aux neurotransmetteurs et est impliquée dans la modulation de l'architecture synaptique (Bogdanik *et al.*, 2004). mGluR est également présent dans le cerveau adulte (Devaud *et al.*, 2008 ; Sinakevitch *et al.*, 2010 ; Kondo *et al.*, 2020, Fig.II2).

B. Récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluRs)

L'analyse du génome de la drosophile a révélé la présence de 15 gènes codant des iGluRs possédant des homologies avec des iGluRs des vertébrés (Meinertzhagen et Lee, 2012). D'après leurs profils d'expression, neuf d'entre eux sont exprimés dans le cerveau de la drosophile (Graveley *et al.*, 2011), dont *NmdAR1*, *NmdaR2*, *KaiR1D*, *GluRIB* et *GluCl α* dans les CPs (Kondo *et al.*, 2020 ; Fig.II2) ainsi que *GluRIA* (Deng *et al.*, 2019).

a. Les NMDA récepteurs (NMDARs)

Chez les mammifères, les NMDARs sont fonctionnels en hétérotétramères. Il existe trois sous-unités : NR1, NR2 et NR3, codés par sept gènes. Un gène code pour la sous-unité NR1, quatre gènes codent NR2, et deux gènes codent NR3. En plus de ces différentes sous-unités, huit isoformes de NR1 ont été identifiées suite à des épissages alternatif (McBain et Mayer, 1994 ; Traynelis *et al.*, 2010). Les différents hétérotétramères ont des spécificités particulières suivant les sous-unités qui les composent. Les NMDARs sont activables par la fixation du glutamate et un co-activateur (la glycine ou la D-serine) en plus d'être sensibles au voltage. Le canal ionique que forme un NMDAR est bloqué par des ions Mg^{2+} qui sont sensibles aux variations de potentiel de membrane. Ainsi, les neurones exprimant les NMDARs s'activent quand ils reçoivent de manière concomitante une dépolarisation de la

membrane et la fixation de glutamate (sur la sous-unité NR2) et de son co-activateur (sur la sous-unité NR1) (Hansen *et al.*, 2018). Les NMDARs ont de multiples rôles, notamment dans la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) qui représentent les mécanismes cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage (Riedel *et al.*, 2003). Les NMDARs sont également impliqués dans la plasticité synaptique (Franchini *et al.*, 2019 ; Hunt et Castillo, 2012). Ainsi, ces récepteurs sont largement étudiés pour leur implication dans la mémoire et l'apprentissage (Riedel *et al.*, 2003) et dans le développement de dysfonctionnement du SNC, comme la maladie d'Alzheimer (Chohan et Iqbal, 2006) ou la dépression (Amidfar *et al.*, 2019).

Chez la drosophile, seulement deux gènes codant deux sous-unités ont été identifiés : *NmdaR1* pour la sous-unité NMDAR1 et le gène *NmdaR2* pour la sous-unité NMDAR2 (Meinertzhagen et Lee, 2012). Contrairement aux mammifères, le gène *NmdaR1* code une unique isoforme protéique de NMDAR1 (Xia *et al.*, 2005). Le gène *NmdaR2* code différentes isoformes suite à huit épissages alternatifs (Xia *et al.*, 2005). Ces récepteurs NMDARs de drosophile possèdent la plupart des caractéristiques physico-chimiques de leurs orthologues mammifères. Notamment l'activation de ces canaux par le glutamate avec un co-activateur tel que la glycine ou la D-serine, la perméabilité au Ca^{2+} , Na^{+} , voltage dépendant et l'inhibition par le Mg^{2+} (Xia *et al.*, 2005 ; Xia *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2017). Des études montrent une expression de ces deux protéines dans le cerveau adulte (Wu *et al.*, 2007 ; Sinakevitch *et al.*, 2010). Ces récepteurs sont impliqués dans la mémoire olfactive (Xia *et al.*, 2005), la consolidation de la mémoire à long terme (Wu *et al.*, 2007 ; Miyashita *et al.*, 2012), l'apprentissage associatif (Miyashita *et al.*, 2023). Ils interviennent dans la plasticité synaptique, la formation des synapses et l'excitabilité glutamatergique. Les NMDARs participent à la régulation des rythmes circadiens et des comportements associés (Song *et al.*, 2017) ainsi que la modulation de l'agressivité impliquerait *NmdaR1* (Zwarts *et al.*, 2011).

b. Les récepteurs Kainate (KAs).

Ces KAs sont fonctionnels lorsqu'ils forment des tétramères avec 5 sous-unités possibles. Ces iGluRs montrent une activation et une désensibilisation rapide et sont perméables aux ions Na^{2+} et au K^{+} (Braga *et al.*, 2004 ; Pinheiro et Mulle, 2006).

Chez la drosophile, dix gènes codant des récepteurs à forte homologie avec les KAs de mammifères ont été identifiés (Meinertzhagen et Lee, 2012) dont KaiR1D. Les

KAs formés avec la sous-unité KaiR1D forment des récepteurs qui permettent l'activation et la désensibilisation rapide du neurone qui les expriment. KaiR1D peut être inhibé à la fois par le NMDA et par l'antagoniste du récepteur NMDA AP5, suggérant une similitude avec les NMDARs au niveau des sites de fixation de ligands (Li *et al.*, 2016). Différentes sous-unités de KAs sont présentes au niveau de la JNM et sont requises pour le bon fonctionnement de ces synapses (Featherstone *et al.*, 2005).

c. Les récepteurs AMPAs

Chez la drosophile, deux gènes codent des récepteurs à forte homologie avec les récepteurs AMPA de mammifères : GluR1 et GluR1B (Meinertzhagen et Lee, 2012). Les récepteurs AMPA sont fonctionnels lorsqu'ils forment un tétramère et permettent une dépolarisation rapide du neurone (Jacob et Weinberg, 2014).

d. Les récepteurs GluCl α

Le récepteur ionotropique au glutamate GluCl α est l'unique représentant des récepteurs au glutamate formant un canal chlorure chez *Drosophila* (Cully *et al.*, 1996). Les GluCl α sont fonctionnels lorsqu'ils forment un pentamère. Quand ils fixent le glutamate, des ions chlorures Cl⁻ entrent dans le compartiment intracellulaire conduisant à une hyperpolarisation du neurone. Ces récepteurs GluCl α ont donc un rôle inhibiteur (Liu et Wilson 2013). Ils sont présents dans le système visuel régulant l'activité on/off des neurones (Molina-Obando *et al.*, 2019). Ils sont également étudiés dans le système olfactif au sein des lobes antennaires (Liu et Wilson 2013). GLRA2, un orthologue humain a été identifié pour participer au développement des maladies du spectre autistique (Marcogliese *et al.*, 2022).

2. Les récepteurs au glutamate exprimés dans les CPs.

D'après Kondo et collaborateurs (2020), six récepteurs au glutamate sont détectés au sein des CPs : l'unique *mGluR*, les deux sous-unités des récepteurs NMDA (*NmdaR1* et *NmdaR2*), la sous-unité *KaiR1D* ainsi qu'un AMPA, *GluRIB* et enfin le récepteur inhibiteur *GluCl α* (Fig.II2).

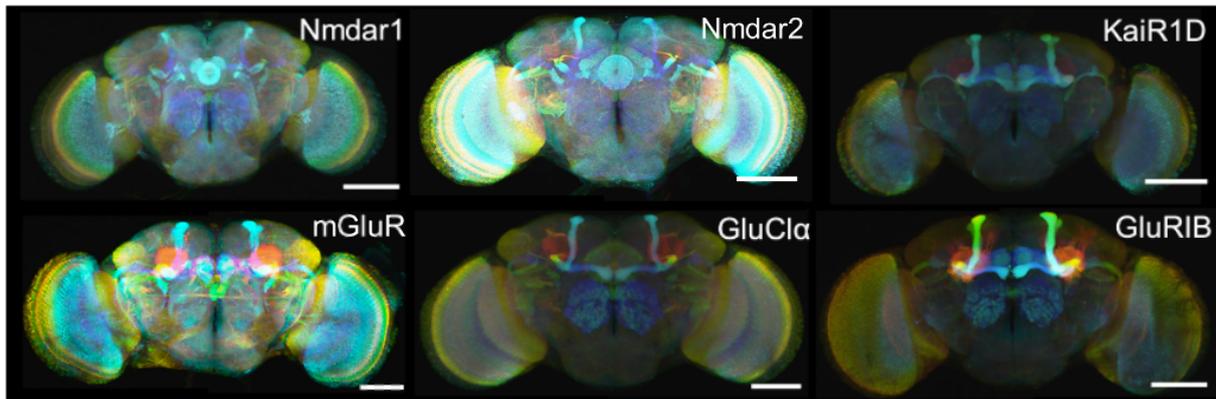


Fig. II2 : Six récepteurs au glutamate exprimés dans les corps pédonculés d'après Kondo et al., 2020.

Reconstruction de cerveaux exprimant la GFP sous le contrôle de différents drivers spécifiques de 6 récepteurs au glutamate. Expression de *NmdaR1*, *NmdaR2*, *KaiR1D*, *GluCl α* , *mGluR* et *GluRIB* dans les CPs. La barre d'échelle = 100 μ m. Modifiée d'après Kondo et al., 2020.

En général, les récepteurs membranaires forment des complexes (clusters) localisés au niveau de sites spécifiques de la membrane plasmique. Cette organisation permet le bon fonctionnement de ces récepteurs. Ce clustering met en jeu des interactions directes et indirectes, via des protéines adaptatrices telles que HOMER, pour les mGluRs (Suh et al., 2018) et les NMDARs (Diagana et al., 2002). Si un partenaire protéique est absent cela peut modifier ces complexes et les récepteurs ne peuvent alors plus fonctionner correctement. Comme par exemple la dérégulation de *homer* dans le SNC de la drosophile induit des défauts du control locomoteur ainsi qu'une incapacité à moduler le comportement de parade sexuelle (Diagana et al., 2002). De plus, l'interaction d'HOMER avec mGluR dans les neurones semble important pour la régulation du sommeil (Ly et al., 2020).

Ainsi, ces récepteurs au glutamate sont cruciaux pour le fonctionnement du SNC, notamment dans la réponse des neurones au glutamate et de la plasticité synaptique. Nous avons mis en évidence que MND est impliquée dans la réponse au glutamate des neurones des CPs (Fig.R17). La deuxième partie de mes recherches s'est

attachée à élucider la fonction de MND dans la réponse des CPs au glutamate et identifier les potentiels récepteurs au glutamate impliqués.

Partie 2

Résultats

Les neurones des corps pédonculés co-expriment *mnd* (*mnd*²⁴⁻¹) et différents récepteurs au glutamate, dont les récepteurs au NMDA.

MND est nécessaire aux KC α/β pour répondre au glutamate via les récepteurs NMDA.

La sous-unité NMDAR1 dans les CPs ne semble pas participer au contrôle du comportement d'agressivité territoriale inter-mâles.

L'activité des CPs NMDARs dépendante semble modulée par l'environnement social uniquement chez les mâles.

mGluR au sein des KC KC α/β et γ semble intervenir dans la régulation de l'agressivité

1. Identification des récepteurs au glutamate exprimés communément avec mnd^{24-1} au sein des KCs.

Avant de commencer l'identification des récepteurs au glutamate, j'ai confirmé l'implication de MND dans la réponse des KCa/β au glutamate avec un autre ARNi ciblant mnd (provenant de Bloomington, $mnd^{dsRNABL}$). Nous retrouvons la même abolition de la réponse calcique des CPs au glutamate avec ces deux ARNi différents ciblant mnd (Fig. R27).

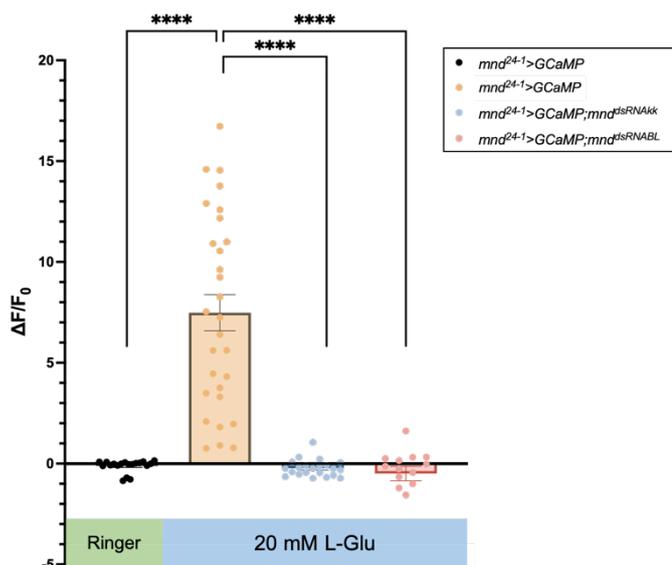


Fig. R27 : MND est nécessaire aux KCa/β pour répondre au L-Glu.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s en présence de Ringer (noir, $n=18$) ou de 20mM de L-Glu (jaune, $n=29$). Ainsi, que des cerveaux dont mnd a été dérégulé dans les KCa/β et γ mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s; $mnd^{dsRNAkk}$ (bleu, $n=22$) et des cerveaux mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s; $mnd^{dsRNABL}$ (rose, $n=14$) après application de 20mM de L-Glu. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0$, \pm SEM des lobes des CPs pour chaque condition. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s après application avec du L-Glu, et les conditions mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s; $mnd^{dsRNABL}$ ou $mnd^{dsRNAkk}$. **** : $p<0.0001$. $n=14$ à 29 lobes.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux récepteurs au glutamate. D'après les études de profils d'expression de Kondo et collaborateurs (2020) six récepteurs au glutamate semblent être exprimés dans les CPs : *NmdaR1*, *NmdaR2*, *KaiR1D*, *GluCl α* , *mGluR* et *GluR1B* (Fig.II2). De plus, les analyses avec l'atlas de séquençage sur cellule unique Scope montrent une coexpression de ces six récepteurs avec mnd dans certaines cellules du cerveau adulte (Fig.R28).

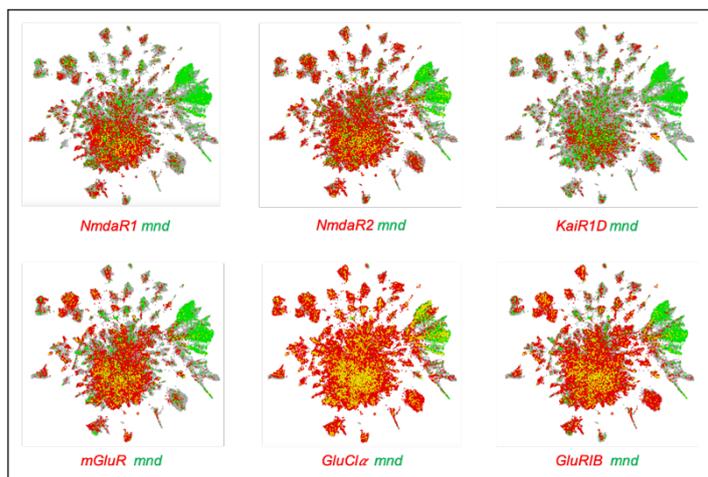


Fig. R28 : Les six récepteurs au glutamate identifiés par Kondo *et al.* dans les CPs semblent être coexprimés avec *mnd* dans des cellules du cerveau adulte.

Expression des six récepteurs au glutamate en rouge et *mnd* en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses grâce à l'outil Scope).

Afin de déterminer de manière expérimentale quel(s) type(s) de récepteur(s) au glutamate peut être partenaire de MND dans les CPs, il faut identifier le(s) récepteur(s) exprimé(s) dans les mêmes cellules que *mnd*, notamment les cellules *mnd*²⁴⁻¹ positives. Nous avons donc utilisé la stratégie d'intersection d'expression génétique. Des drivers Gal4 insérés au locus endogène des gènes codants les six récepteurs au glutamate d'intérêt ont été utilisés (Deng *et al.*, 2019 et Kondo *et al.*, 2020). Ces insertions (par recombinaison homologue médiée par l'intégrase PhiC31) permettent en théorie de refléter le plus fidèlement possible le profil d'expression de ces gènes, en conservant l'intégrité des séquences régulatrices et leur environnement génétique propre (sites de fixations des facteurs de transcription, et de régulateurs de la transcription).

Comme pour les précédentes expériences d'intersection d'expression génétique, nous avons vérifié les profils d'expression des drivers à l'aide d'un rapporteur mCD8::GFP, puis nous avons réalisé les intersections d'expression avec le driver *mnd*²⁴⁻¹-*LexA*.

A. La sous-unité 1 des récepteurs NMDA (*NmdaR1*)

NmdaR1-Gal4 conduit à une expression de la GFP dans les KCa/β et les KCa'/β' (Fig.R29). Sur les coupes transversales de pédoncule des CPs, les KCa/β core ne semblent pas exprimer la GFP (Fig.R29). Cela est cohérent avec Sinakevitch et collaborateurs (2010) qui montrent par immunomarquage que NMDAR1 est localisée

dans les $KC\alpha/\beta$ et n'est pas présente dans les $KC\alpha/\beta$ core. Cependant, ils montrent également une expression dans les $KC\gamma$, ce que nous n'avons pas observé. D'après Kondo et collaborateurs (2020), *NmdaR1* n'est pas exprimé dans les $KC\gamma$. Le marquage α -MND, au niveau des KCs, semble colocaliser partiellement avec le signal GFP indiquant que *NmdaR1* et MND se trouveraient potentiellement dans les mêmes cellules. Nous pouvons également observer la présence de GFP dans une autre structure intégrative du SNC : le corps ellipsoïde qui fait partie du complexe central. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Wu et collaborateurs (2007) qui montrent la présence de NMDAR1 dans le corps ellipsoïde adulte.

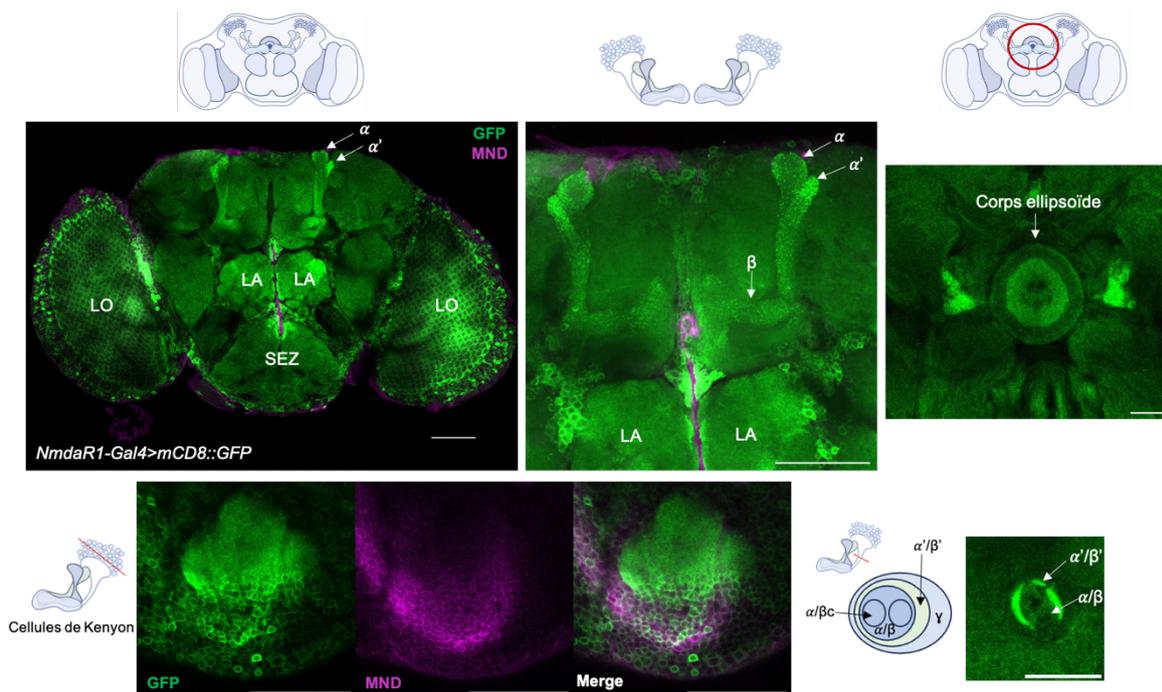


Fig. R29 : *NmdaR1-Gal4* est exprimé dans les $KC\alpha/\beta$ (excepté les $KC\alpha/\beta$ core) et les $KC\alpha'/\beta'$.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* dirigé par le driver *NmdaR1-Gal4*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour les autres images. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Avec l'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-LexA* et *NmdaR1-Gal4*, la GFP est présente dans les $KC\alpha/\beta$, et, pour 4/10 cerveaux analysés, la GFP est également observée dans les $KC\alpha'/\beta'$, montrant une expression de *mnd²⁴⁻¹* et *NmdaR1* communément dans ces neurones (Fig.R30). Les sections de pédoncule ne montrent pas de GFP dans les $KC\alpha/\beta$ core, ce qui est cohérent avec le fait que les drivers *NmdaR1-Gal4* et *mnd²⁴⁻¹-LexA* ne ciblent pas ces neurones (Fig.R29 ; Fig.R9). Ce qui est étonnant est la présence de GFP dans les $KC\alpha'/\beta'$, alors que nous avons montré que

mnd²⁴⁻¹ n'était pas exprimé dans ces neurones (Fig.R12). De plus, il apparaît que des neurones du corps ellipsoïde expriment communément les deux drivers, car de la GFP est observable dans cette structure. Ces résultats sont retrouvés par Wu et collaborateurs (2007) qui montrent la présence de NMDAR1 dans le corps ellipsoïde adulte. De plus, nous avons montré que le driver *mnd²⁴⁻¹-Gal4* est également exprimé dans cette structure (Fig.R8). L'expression de la séquence régulatrice de *mnd*, *mnd²⁴⁻¹*, est présente dans ces neurones mais aucun marquage α -MND n'a été détecté dans le corps ellipsoïde (Fig.R8). De plus, nous observons de la GFP dans des cellules localisées dans la PI qui pourraient être les IPCs ou les neurones DH44+ (Fig.R31) suggérant que *mnd* et *Nmdar1* sont exprimés dans ces cellules.

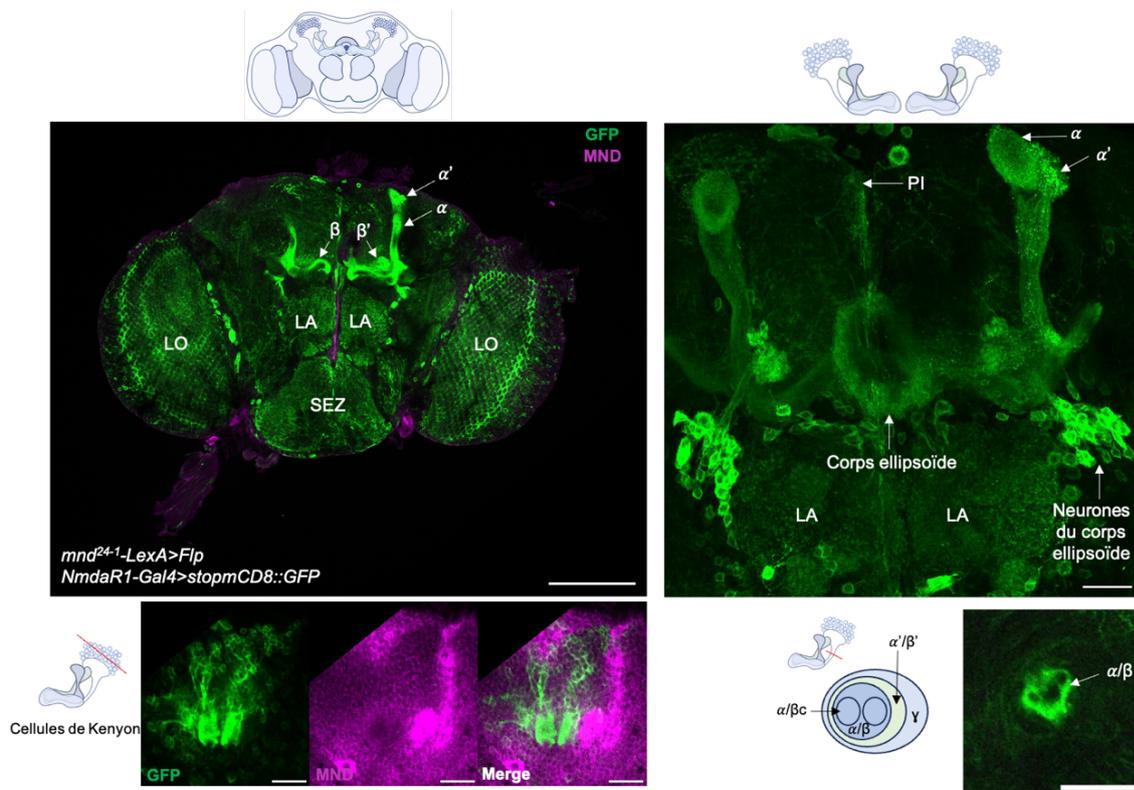


Fig. R30 : *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *Nmdar1-LexA* sont communément exprimés dans les KC α/β (excepté les KC $\alpha/\beta/c$) et les KC α'/β' .

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* de cerveaux *mnd²⁴⁻¹-LexA>Flp/Nmdar1-Gal4>stopmCD8::GFP*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=10$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour les autres images. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

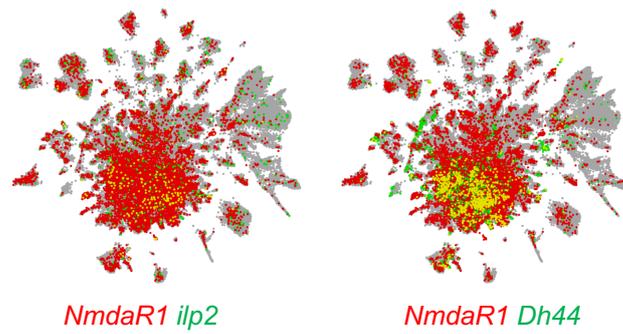


Fig. R31 : *NmdaR1* et *ilp2* ou *Dh44* sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de *NmdaR1* en rouge et *ilp2* ou *Dh44* en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses grâce à l'outil Scope).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons fait l'intersection d'expression dans l'autre sens, avec le driver *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et le driver *NmdaR1-LexA*. Dans le cerveau témoin (*NmdaR1-LexA*>*mCD8::GFP*) la GFP apparaît plus ubiquitaire qu'avec le driver *NmdaR1-Gal4* et semble être présente dans les CPs (Fig.R32). Il apparaît que *NmdaR1-LexA* est exprimé uniquement dans les $KC\alpha'/\beta'$, alors que le *NmdaR1-Gal4* (même séquence régulatrice) conduit à une expression dans les $KC\alpha'/\beta'$ et $KC\alpha/\beta$ (Fig.R29). Nous retrouvons également l'expression de *NmdaR1* dans le corps ellipsoïde (Fig.R32).

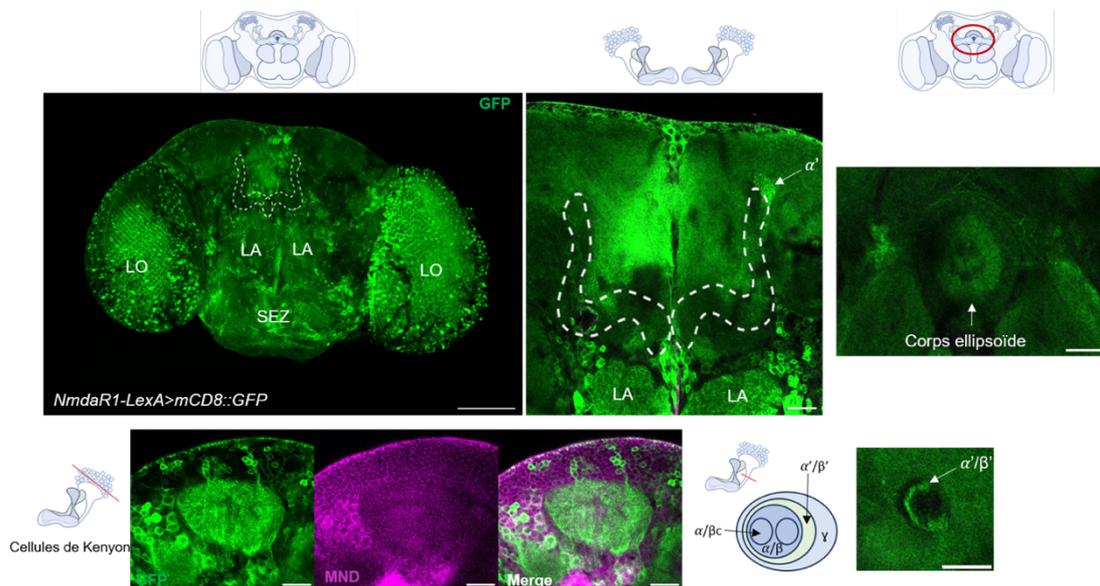


Fig. R32 : *NmdaR1-LexA* est exprimé dans les $KC\alpha'/\beta'$

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* grâce au driver *NmdaR1-LexA*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=3$. La barre d'échelle = $100\mu\text{m}$ pour la Z projection du cerveau entier et $20\mu\text{m}$ pour les autres images. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

L'expérience d'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR1-LexA* montre la présence de la GFP dans ce qui semble être des KC α / β , ainsi que des cellules de la PI. Nous pouvons observer que les cellules *mnd²⁴⁻¹-Gal4* qui coexpriment *NmdaR1-LexA* sont peu nombreuses (Fig.R33).

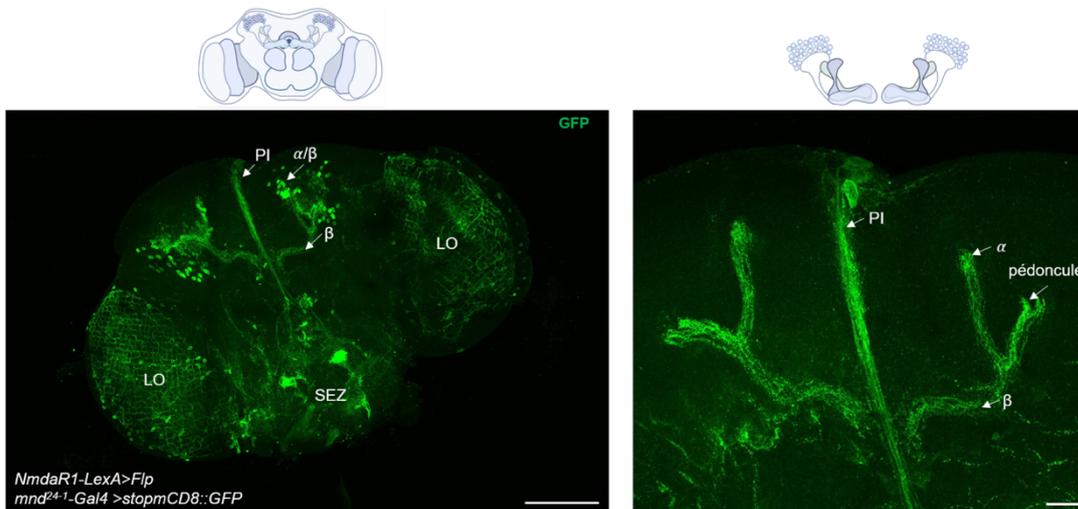


Fig. R33 : *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR1-LexA* sont présents dans les KC α / β .

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* de cerveaux *NmdaR1-LexA>flp/mnd²⁴⁻¹-Gal4>stopmCD8::GFP*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert). $n=3$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Les intersections d'expressions semblent mettre en lumière la coexpression de *mnd* et *NmdaR1* dans certaines KC α / β et ne semblent pas être exprimés dans les KC α / β core.

Une autre manière de confirmer nos résultats est d'utiliser un rapporteur tel que la GFP sous le contrôle de *mnd²⁴⁻¹-Gal4*, en même temps qu'un autre rapporteur tel que la RFP dirigée par *NmdaR1-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-nls::GFP/NmdaR1-LexA>LexAop-nls::RFP*). Ainsi, les cellules *mnd²⁴⁻¹* auront un noyau vert (GFP positives), alors que les cellules exprimant *NmdaR1* seront rouges (RFP positives). Les cellules qui expriment communément *mnd²⁴⁻¹* et *NmdaR1* apparaîtront orange (GFP et RFP positives) (Fig.R34).

De manière intéressante, très peu de cellules sont GFP et RFP positives, ce qui suggère qu'uniquement quelques KC α / β expriment communément ces outils *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR1-LexA*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec l'intersection d'expression de ces deux drivers qui montrent très peu de cellules communes (Fig.R33). Il serait intéressant de faire cette expérience dans l'autre sens

(*mnd²⁴⁻¹-LexA* et *NmdaR1-Gal4*) afin d'évaluer le nombre de cellules ciblées par chaque driver et de déterminer leur nature exacte.

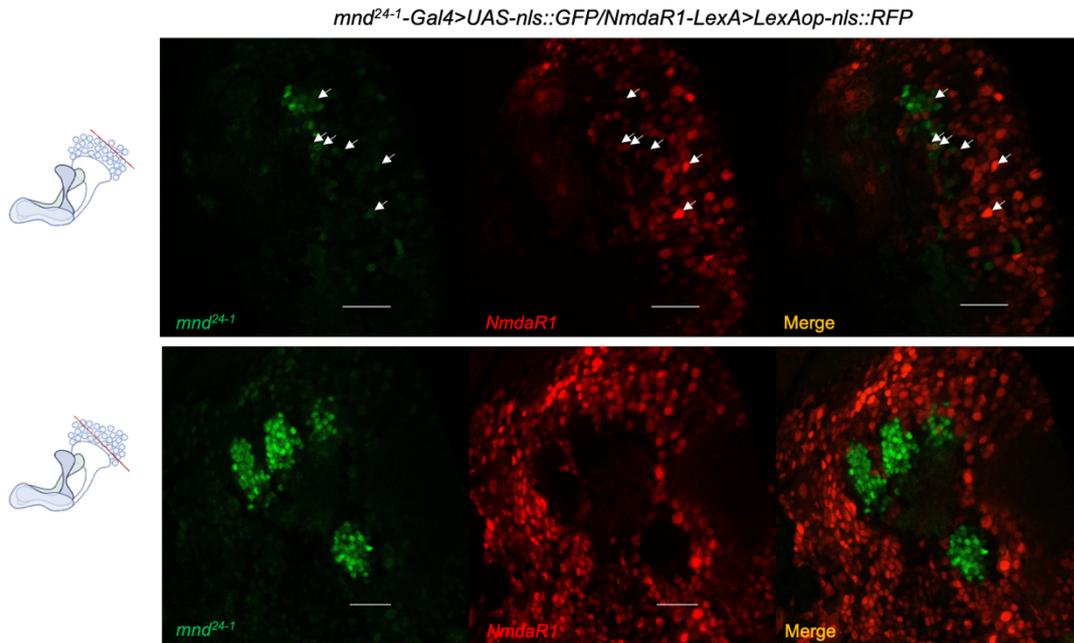


Fig. R34 : *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR1-LexA* sont communément exprimés dans quelques KC α/β .

Images représentatives de microscopie confocale au niveau des KCs de l'expression de *mnd²⁴⁻¹-Gal4>nls::GFP* (vert) et *NmdaR1-LexA>nls::RFP* (rouge) de cerveaux (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-nls::GFP/NmdaR1-LexA>LexAop-nls::RFP*). La superposition de ces deux rapporteurs est visible en orange. Il semble que peu de KCs expriment *mnd* et *NmdaR1* communément. $n=4$. La barre d'échelle = 20 μ m.

B. La sous-unité 2 des récepteurs NMDA (*NmdaR2*)

Avec le driver *NmdaR2-Gal4* (*NmdaR2-Gal4>mCD8::GFP*) la GFP est observée dans les $KC\alpha/\beta$ et plus faiblement dans les $KC\alpha'/\beta'$ (Fig.R35). De plus, il semble, avec les sections de pédoncule, qu'il y ait une expression dans les $KC\alpha/\beta$ core, contrairement à *NmdaR1*. Le marquage α -MND au niveau des KCs colocalise partiellement avec le signal α -GFP, suggérant que *NmdaR2* et MND se trouveraient communément dans certaines de ces cellules (Fig.R35).

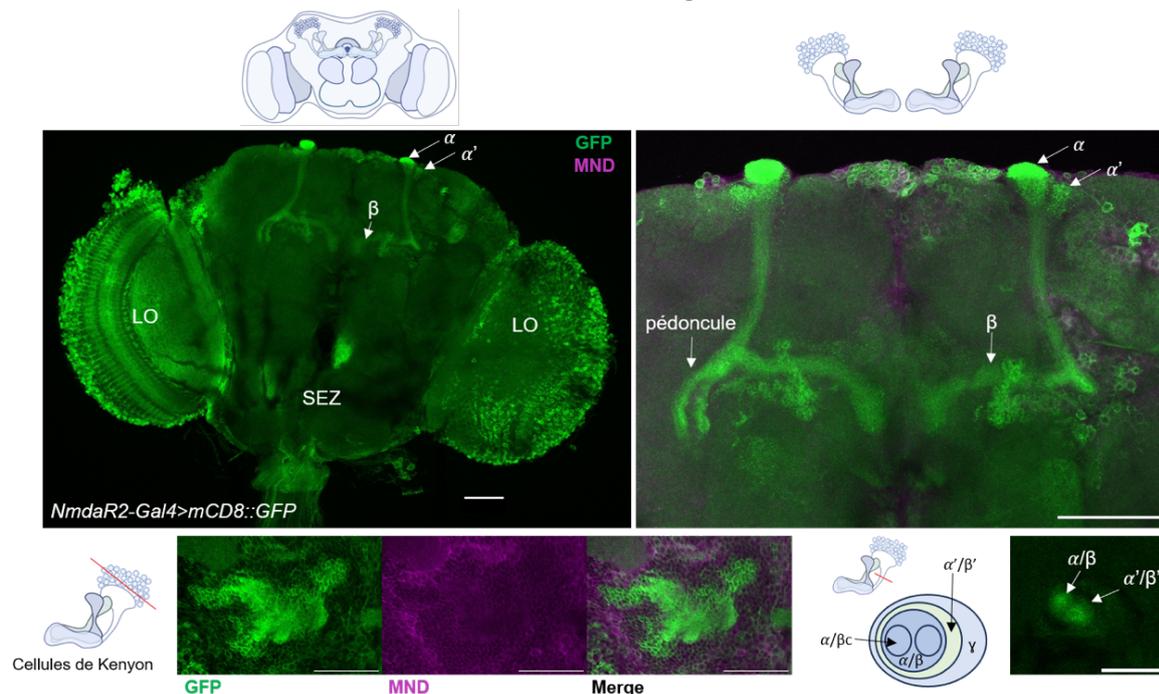


Fig. R35 : *NmdaR2-Gal4* est exprimé dans les $KC\alpha/\beta$ et $KC\alpha'/\beta'$.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* sous le driver *NmdaR2-Gal4*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Lorsque l'on regarde l'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-LexA* et *NmdaR2-Gal4*, la GFP est présente uniquement dans les $KC\alpha/\beta$ et absente des $KC\alpha/\beta$ core, ce qui indique que *mnd²⁴⁻¹* et *NmdaR2* sont conjointement exprimés uniquement dans ces neurones (Fig.R36). De plus, il semble que des neurones formant le corps ellipsoïde expriment communément les deux drivers, comme pour *NmdaR1*. Ce qui est cohérent avec Wu et collaborateurs (2007) qui montrent également la présence de NMDAR2 dans le corps ellipsoïde. Par ailleurs, des cellules de la PI expriment également la GFP, suggérant une expression de *NmdaR2* et *mnd* dans ces cellules. De même que pour *NmdaR1*, ces cellules pourraient être les IPCs ou les

neurones DH44+ (Fig.R37). De plus, le marquage α -MND est présent dans ces cellules de la PI et apparaît sous forme de granulation (Fig.R38). Ce marquage rappelle le marquage α -MND dans le réticulum endoplasmique des IPCs chez la larve (Manière *et al.*, 2016).

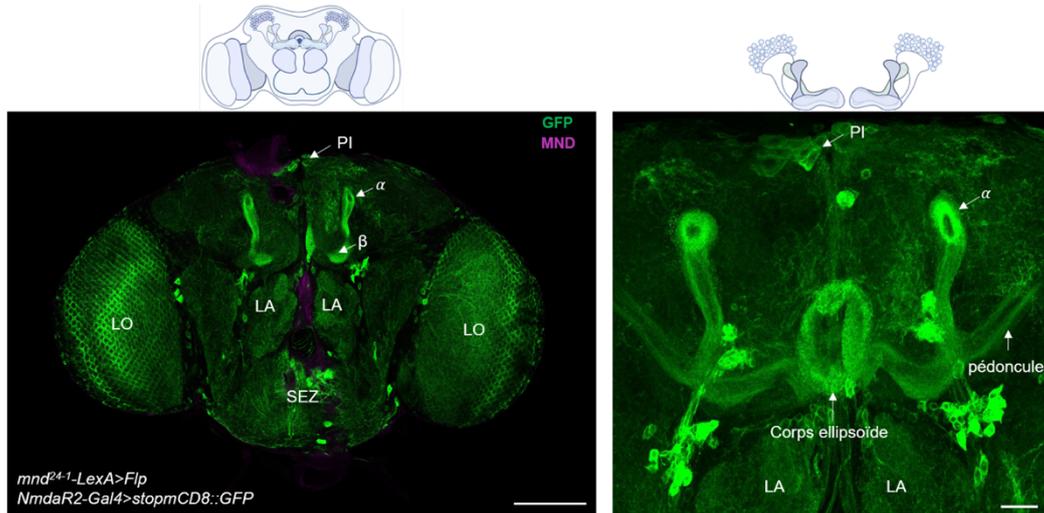


Fig. R36 : mnd^{24-1} -LexA et NmdaR2-Gal4 sont communément exprimés dans les KC α/β (excepté les KC α/β c).

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de mCD8 ::GFP de cerveaux mnd^{24-1} LexA>Flp/NmdaR2-Gal4>stopmCD8 ::GFP. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. n=5. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-césophagienne.

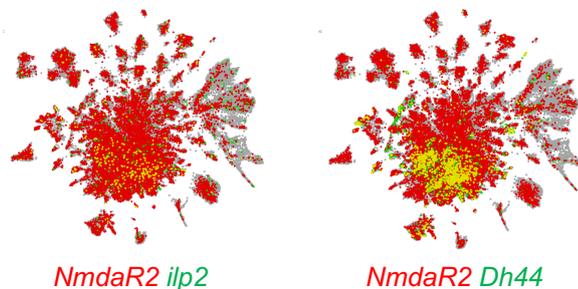


Fig. R37 : NmdaR2 et $ilp2$ ou Dh44 sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de NmdaR2 en rouge et $ilp2$ ou Dh44 en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses grâce à l'outil Scope).

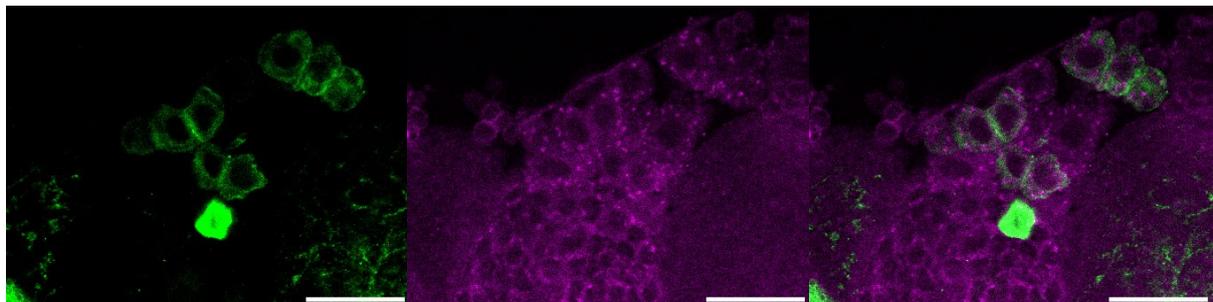


Fig. R38 : mnd^{24-1} -LexA et NmdaR2-Gal4 sont communément exprimés dans des cellules de la PI.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* de cerveaux *mnd²⁴⁻¹ - LexA>Flp/NmdaR2-Gal4>stopmCD8::GFP*. *n*=5. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. Barre d'échelle = 20 μ m.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons fait l'intersection d'expression dans l'autre sens, avec le driver *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR2-LexA*.

Dans les cerveaux *NmdaR2-LexA> mCD8::GFP*, il semble que *NmdaR2-LexA* ne permette pas l'expression de la GFP dans les CPs (Fig.R39). Ce qui est étonnant car le driver *NmdaR2-Gal4* (avec la même séquence régulatrice) conduit à une expression de la GFP dans les $KC\alpha'/\beta'$ et $KC\alpha/\beta$ (Fig.R35). L'expression de la GFP conduit par *NmdaR2-LexA* est localisée dans le corps ellipsoïde comme observée avec le driver *NmdaR2-Gal4*.

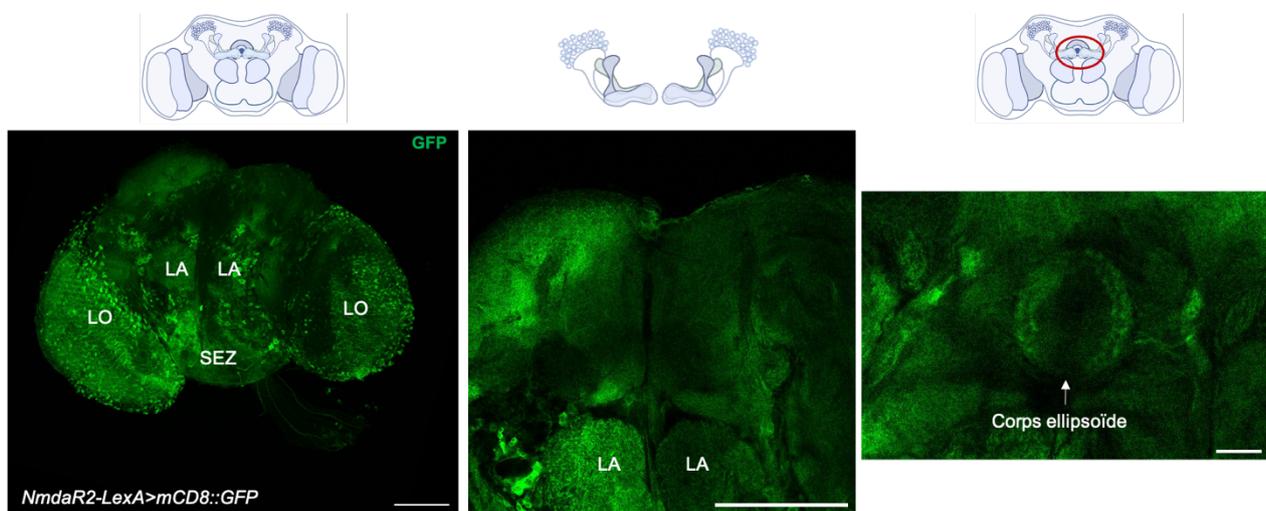


Fig. R39 : *NmdaR2-LexA* ne semble pas s'exprimé dans les CPs.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* sous le driver *NmdaR2-LexA*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP. *n*=3. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs et du corps ellipsoïde. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-césophagienne.

L'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-Gal4* et *NmdaR2-LexA*, montre que la GFP est présente dans les $KC\alpha/\beta$, suggérant une coexpression de *mnd* et *NmdaR2* dans ces neurones, également des neurones dans la PI, mais pas dans le corps ellipsoïde (Fig.R40). Ces résultats sont surprenants et intéressants car l'expression dans les cellules $KC\alpha/\beta$ ne devraient pas être observables étant donné que dans les cerveaux témoins, le driver *NmdaR2-LexA* ne semble pas être exprimé dans les CPs.

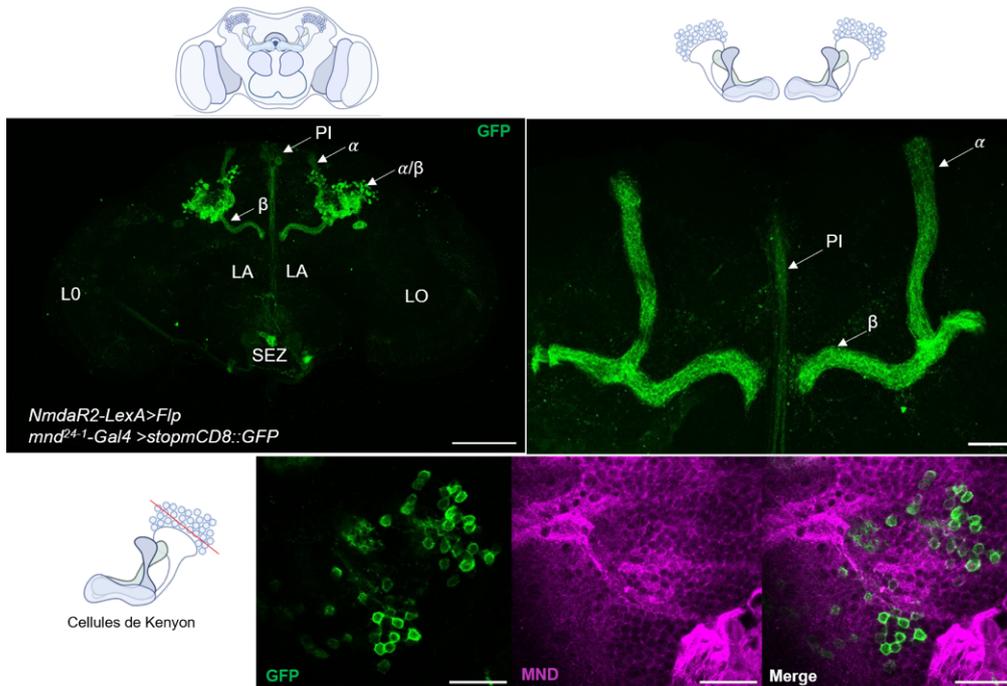


Fig. R40 : mnd^{24-1} -Gal4 et $NmdaR2$ -LexA sont communément exprimés dans des KC α/β .

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de $mCD8::GFP$ de cerveaux $NmdaR2$ -LexA>flp / mnd^{24-1} -Gal4>stopmCD8::GFP. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=4$. La barre d'échelle = 100 μm pour la Z projection du cerveau entier et 20 μm pour la Z projection des lobes des CPs et les images des KCs. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

C. La sous-unité KaiR1D des récepteurs Kainates

Dans les cerveaux *KaiR1D-Gal4>mCD8::GFP* la GFP est observée dans les $KC\alpha/\beta$, incluant les $KC\alpha/\beta$ core, ainsi que les $KC\alpha'/\beta'$ et $KC\gamma$ (Fig.R41). Le marquage α -MND montre une colocalisation de la GFP et MND au niveau des KCs, suggérant que *KaiR1D* et MND sont présents dans les mêmes cellules.

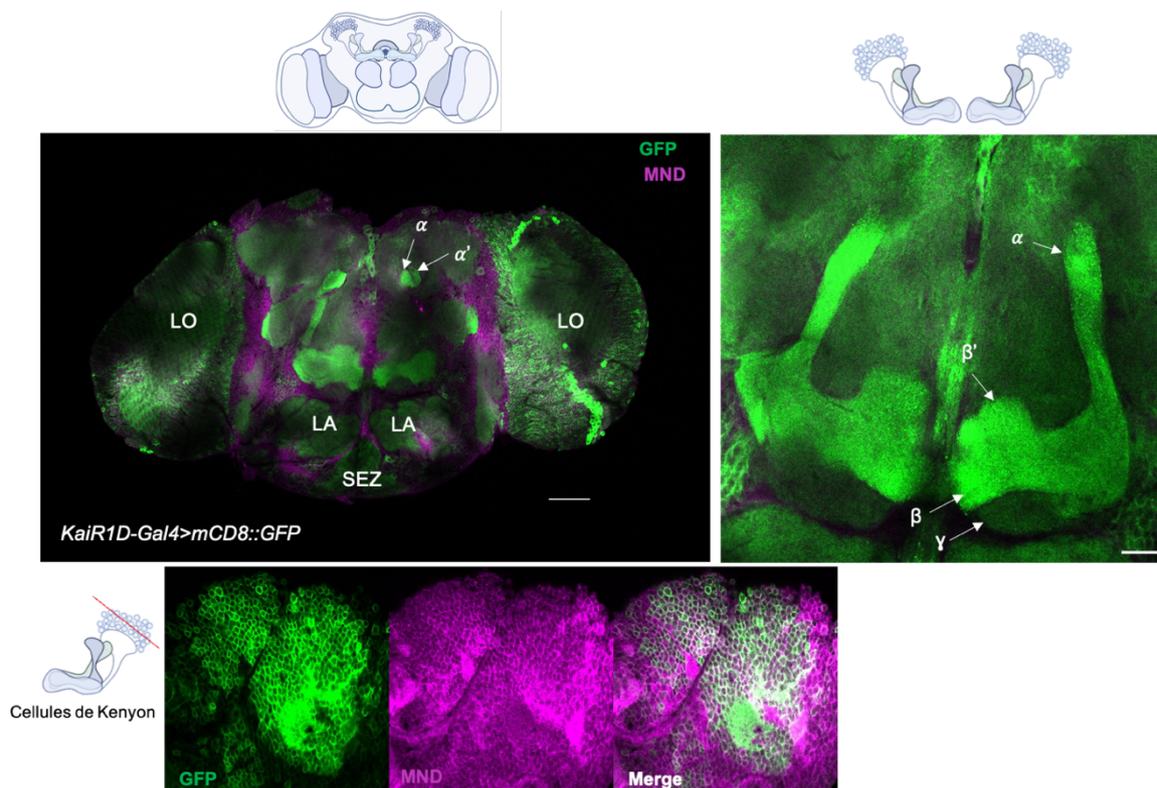


Fig. R41 : *KaiR1D-Gal4* est exprimé dans les $KC\alpha/\beta$, les $KC\alpha'/\beta'$ et les $KC\gamma$.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* sous le driver *KaiR1D-Gal4*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=4$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs et les images des KCs. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Avec l'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-LexA* et *KaiR1D-Gal4*, les cerveaux montrent une expression du rapporteur GFP dans les $KC\alpha/\beta$, les $KC\gamma$ et aucune dans les $KC\alpha/\beta$ core (Fig.R42). Ainsi, *KaiR1D* et *mnd²⁴⁻¹* sont communément exprimés dans ces neurones. Tout comme pour les intersections avec les *NmdaRs*, *KaiR1D* semble être communément exprimé avec *mnd²⁴⁻¹* dans des neurones du corps

ellipsoïde, ainsi que dans des cellules de la PI qui pourraient être potentiellement les IPCs ou les neurones DH44+ (Fig.R43).

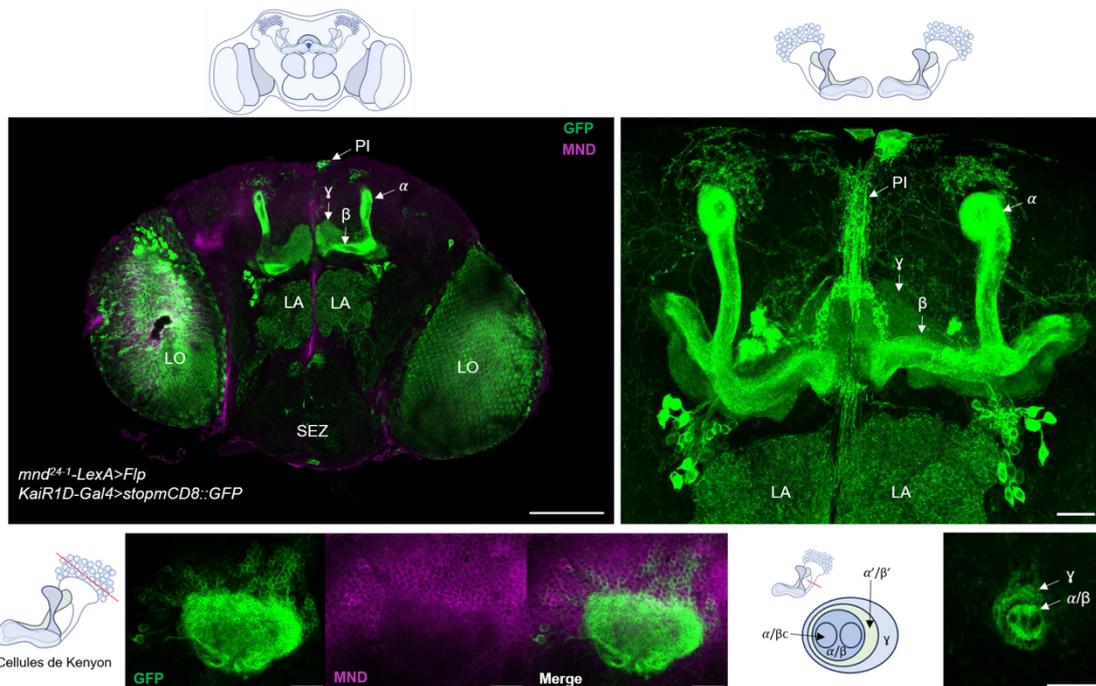


Fig. R42 : mnd^{24-1} -LexA et KaiR1D-Gal4 sont communément exprimés dans les KC α/β (excepté les KC α/β c) et les KC γ .

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de $mCD8::GFP$ de cerveaux mnd^{24-1} -LexA>Flp/KaiR1D-Gal4>stopmCD8::GFP. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs ainsi que pour les images des KCs et section de pédoncule. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

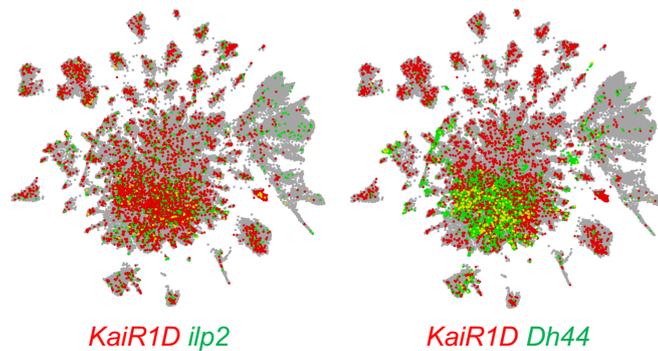


Fig. R43 : KaiR1D et $ilp2$ ou Dh44 sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de KaiR1D en rouge et $ilp2$ ou Dh44 en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses grâce à l'outil Scope).

D. Le récepteur métabotrope mGluR

Dans les cerveaux témoins *mGluR-Gal4>mCD8::GFP*, la GFP est observable dans les cellules $KC\alpha/\beta$, les $KC\alpha'/\beta'$ et les $KC\gamma$ (Fig.R44). Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Kondo et collaborateurs (2020). Il semble que *mGluR* ne soit pas exprimé dans les $KC\alpha/\beta$ core, comme le montre la section de pédoncule. De plus, une colocalisation partielle du signal GFP et α -MND suggère une expression commune de *mGluR* et MND par les cellules des CPs.

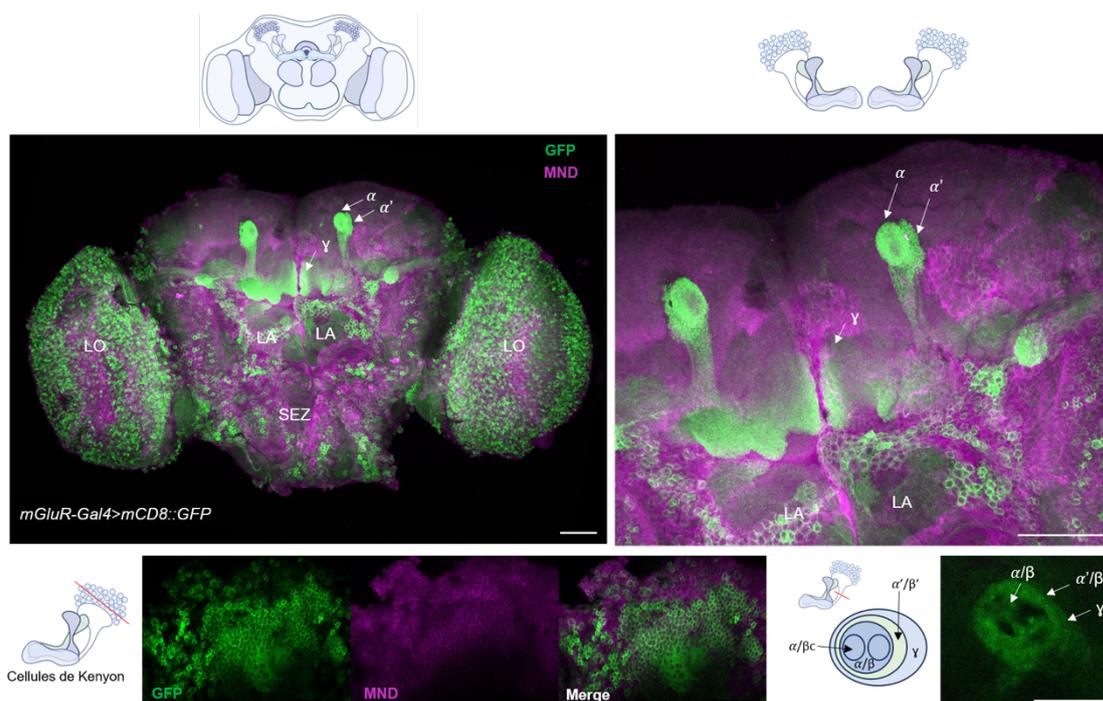


Fig. R44 : *mGluR-Gal4* est exprimé dans les $KC\alpha/\beta$ (excepté les $KC\alpha/\beta$ c), les $KC\alpha'/\beta'$ et les $KC\gamma$.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* sous le driver *mGluR-Gal4*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = 100 μ m pour la Z projection du cerveau entier et 20 μ m pour la Z projection des lobes des CPs ainsi que pour les images des KCs et section de pédoncule. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

Avec l'intersection d'expression génétique de *mnd²⁴⁻¹-LexA* et *mGluR-Gal4*, les cerveaux montrent une expression de la GFP dans les $KC\alpha/\beta$, les $KC\gamma$, très faiblement dans les $KC\alpha'/\beta'$, et aucune dans les $KC\alpha/\beta$ core (Fig.R45). Nous n'observons pas de GFP dans l'EB suggérant que *mGluR* et *mnd* ne sont pas communément exprimés dans cette structure. Sachant que Kahsai et collaborateurs (2012) montrent la présence de la protéine mGluR dans l'EB adulte et que le driver *mnd²⁴⁻¹-Gal4* a montré une expression dans cette structure (Fig.R8), l'absence de GFP lors de cette intersection suggère que ce sont différents types de neurones composant l'EB qui expriment ces deux drivers.

De plus, comme pour les *NmdaRs*, *mGluR* semble communément exprimé avec *mnd²⁴⁻¹* dans des cellules de la PI qui pourrait être les IPCs ou des neurones exprimant *Dh44* (Fig.R46).

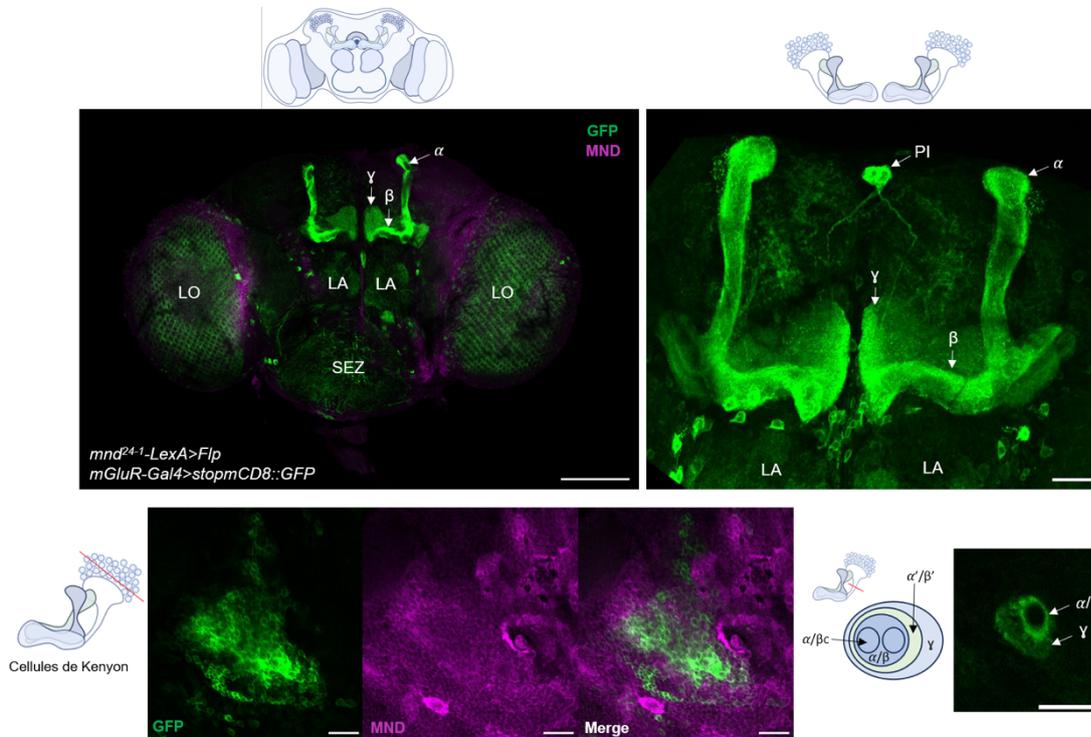


Fig. R45 : *mnd²⁴⁻¹-LexA* et *mGluR-Gal4* sont communément exprimés dans les KCα/β (excepté les KCα/βc) et les KCγ.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de *mCD8::GFP* de cerveaux *mnd²⁴⁻¹-LexA>Flp/mGluR-Gal4>stopmCD8::GFP*. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α-GFP (vert) et un marquage α-MND est observable en magenta. n=5. La barre d'échelle = 100 μm pour la Z projection du cerveau entier et 20 μm pour la Z projection des lobes des CPs ainsi que pour les images des KCs et section de pédoncule. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

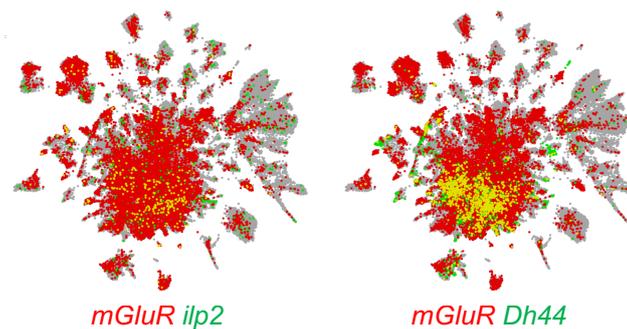


Fig. R46 : *mGluR* et *ilp2* ou *Dh44* sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de *mGluR* en rouge et *ilp2* ou *Dh44* en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses grâce à l'outil Scope).

E. Le récepteur ionotropique $GluCl\alpha$

Dans les cerveaux témoins $GluCl\alpha-Gal4 > mCD8 ::GFP$, l'expression de la GFP est localisée dans les lobes $KC\alpha/\beta$ uniquement et les sections de pédoncules révèlent la présence de la GFP dans les $KC\alpha/\beta$ core (Fig.R47). De plus, une colocalisation partielle du signal GFP et α -MND est observable dans les $KC\alpha/\beta$, ce qui suggère une expression commune dans ces cellules.

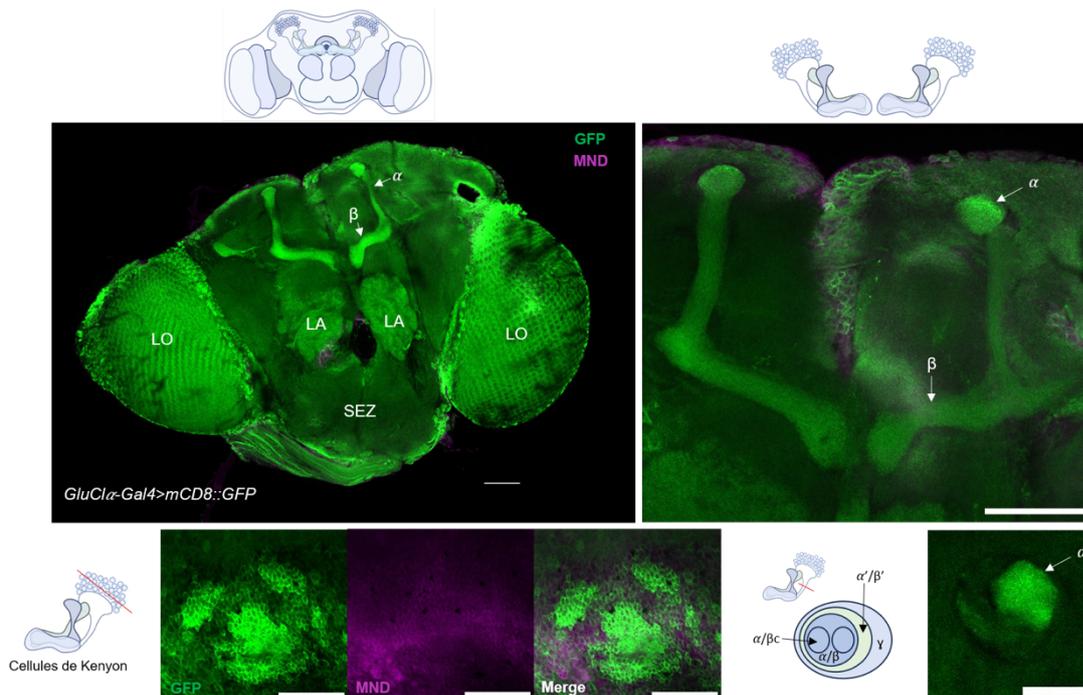


Fig. R47 : $GluCl\alpha-Gal4$ est exprimé dans les $KC\alpha/\beta$.

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de $mCD8 ::GFP$ sous le driver $GluCl\alpha-Gal4$. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = $100 \mu m$ pour la Z projection du cerveau entier et $20 \mu m$ pour la Z projection des lobes des CPs ainsi que pour les images des KCs et section de pédoncule. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

L'intersection génétique de $GluCl\alpha-Gal4$ et $mnd^{24-1}-LexA$ montre une expression de la GFP dans les $KC\alpha/\beta$, en excluant les $KC\alpha/\beta$ core (Fig.R48). De plus, des cellules de la PI sont $GluCl\alpha$ et mnd^{24-1} positives, ces cellules pourraient là encore être des cellules IPCs ou des neurones exprimant $Dh44$ (Fig.R49).

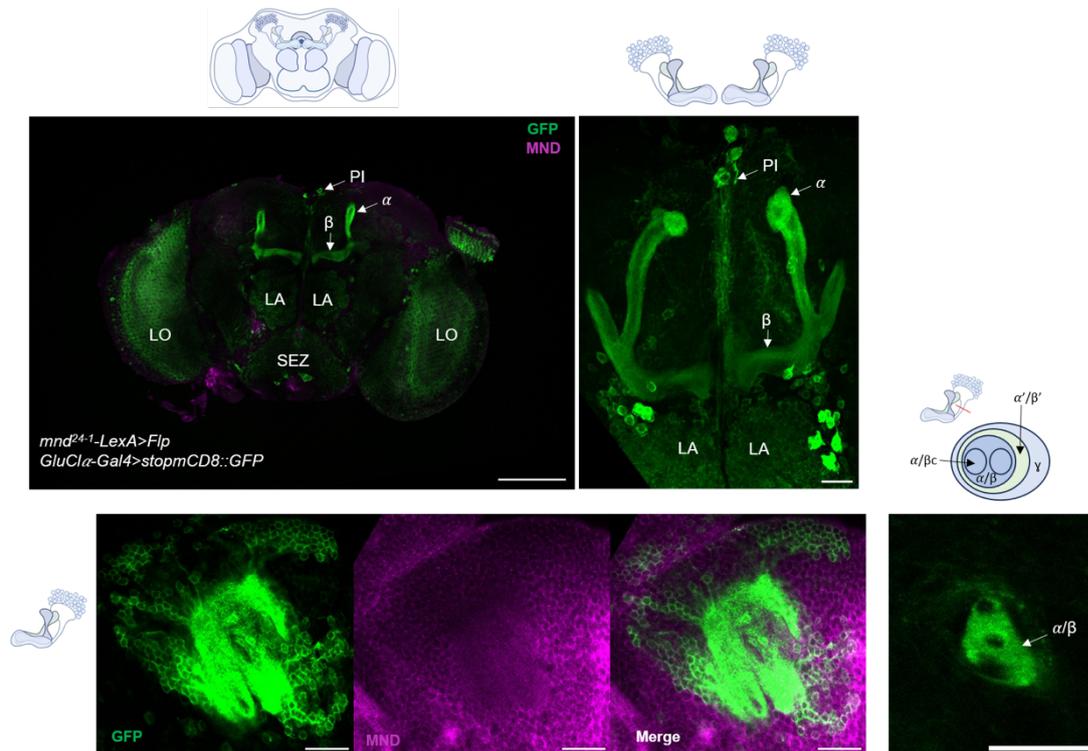


Fig. R48 : mnd^{24-1} -LexA et $GluCl\alpha$ -Gal4 sont communément exprimés dans les KC α/β (excepté les KC $\alpha/\beta c$).

Images représentatives de microscopie confocale de l'expression de $mCD8::GFP$ de cerveaux mnd^{24-1} -LexA>Flp/ $GluCl\alpha$ -Gal4>stopmCD8::GFP. Le signal GFP est amplifié par un marquage anticorps α -GFP (vert) et un marquage α -MND est observable en magenta. $n=6$. La barre d'échelle = 100 μm pour la Z projection du cerveau entier et 20 μm pour la Z projection des lobes des CPs ainsi que pour les images des KCs et section de pédoncule. LO : lobe optique ; LA : lobe antennaire ; SEZ : zone sous-œsophagienne.

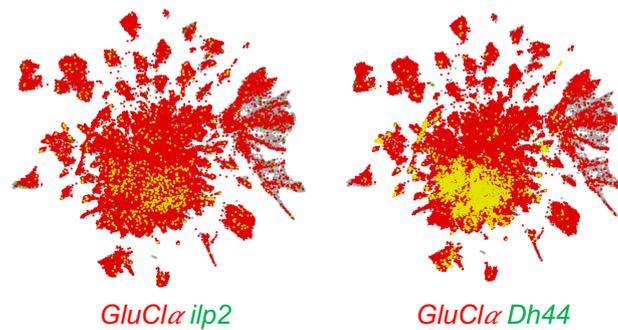


Fig. R49 : $GluCl\alpha$ et $ilp2$ ou $Dh44$ sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de $GluCl\alpha$ en rouge et $ilp2$ en vert (A) ou $Dh44$ (B) et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses avec l'outil Scope).

En conclusion, avec le driver *mnd²⁴⁻¹-LexA*, les expériences d'intersections montrent que *mnd²⁴⁻¹* est conjointement exprimé avec *NmdaR1*, *NmdaR2*, *KaiR1D*, *mGluR* et *GluCl α* dans les KC α/β , en excluant les KC α/β core ; et est communément exprimé avec *mGluR* et *KaiR1D* dans les KC γ . Nous observons des différences de profil d'expression entre les drivers Gal4 et LexA pour un même gène, pourtant inséré à leur locus endogène, ce qui a également été observé par Deng et collaborateurs (2019). Nous avons également observé ces différences d'expressions avec les deux drivers *mnd²⁴⁻¹* (Gal4 et LexA) construits avec la même séquence régulatrice de *mnd*, mais qui eux ont été inséré à un locus non endogène (attP2) (Fig.R7 et Fig.R9).

2. Implication des récepteurs au glutamate dans l'activité dépendante de MND des KC α/β

A. Les récepteurs au Glutamate

Le glutamate pourrait donc se fixer sur les KC α/β (exprimant *mnd²⁴⁻¹*) grâce aux différents RGlus identifiés. Nous avons démontré précédemment que MND intervient dans l'activation des KC α/β en présence de glutamate (Fig.R17). Nous souhaitons déterminer quel type de récepteur au glutamate est impliqué et pourrait interagir (directement ou indirectement) avec MND pour moduler la réponse des KC α/β . Afin de répondre à cette question, nous avons dérégulé chaque récepteur au glutamate spécifiquement dans les cellules KC α/β exprimant *mnd²⁴⁻¹* par ARNi et observer la réponse des CPs au glutamate par imagerie calcique fonctionnelle.

Quels que soient les récepteurs dérégulés, *NmdaR1*, *NmdaR2*, *NmdaR1etR2*, *mGluR* et *GluCl α* dans les cellules KC α/β (*mnd²⁴⁻¹-Gal4*), une abolition de la réponse calcique est observée en présence de 20 mM de L-Glu (Fig.R50). Ces résultats semblent indiquer que l'ensemble des récepteurs au glutamate testés jouent un rôle dans l'activité des KC α/β en réponse au L-Glu. Ces résultats sont étonnants, notamment ceux obtenus pour le récepteur *GluCl α* qui est connu pour être inhibiteur chez la drosophile (Cully *et al.*, 1996). De manière intéressante il a déjà été montré qu'une dérégulation des récepteurs *NmdaRs*, *KaiR1D*, et *GluCl α* individuellement dans le corps en éventail du complexe central, conduit également à une abolition de la réponse au glutamate (Musso *et al.*, 2021).

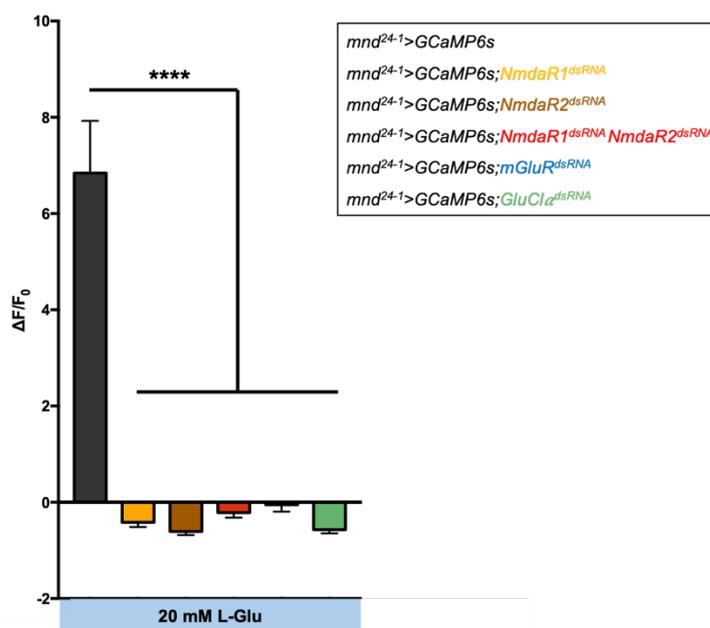


Fig. R50 : Différents RGlus sont nécessaires aux CPs pour répondre au glutamate.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s* après application de 20mM de L-Glu (noir, n=22) ou des cerveaux dérégulés pour *NmdaR1* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR1^{dsRNA}* (orange, n=15), dérégulés pour la voie *NmdaR2* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR2^{dsRNA}* (marron, n=15) ; dérégulés pour *NmdaR1* et *R2* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR1^{dsRNA}; NmdaR2^{dsRNA}*) (rouge, n=18), dérégulés pour *mGluR* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s; mGluR^{dsRNA}*) (bleu, n=17) ou dérégulés pour *GluClα* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;GluClα^{dsRNA}*) (vert, n=18). L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0$, \pm SEM des lobes des CPs pour chaque condition. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s* après application de 20mM de L-Glu et chaque condition où les RGlus ont été dérégulés. **** : $p < 0.0001$. n=15 à 22 lobes.

B. Les récepteurs NMDA (NMDARs)

Un des inconvénients d'utiliser le glutamate est qu'il peut se fixer et activer différents types de récepteurs au glutamate en même temps et avoir des actions antagonistes. Il est donc difficile de conclure sur le rôle de chaque récepteur individuellement dans l'activation ou non des CPs en utilisant directement le glutamate. Afin de disséquer les effets de chacun, il est possible d'utiliser des molécules pharmacologiques spécifiques (antagonistes ou agonistes) capables d'inhiber ou d'activer un seul type de récepteur au glutamate. Comme *NmdaR1* et *NmdaR2* sont coexprimés avec *mnd²⁴⁻¹* dans des $KC\alpha/\beta$ (Fig.R30 ; Fig.R33 ; Fig.R36 ; Fig.R40), nous avons choisi d'étudier en premier lieu ces récepteurs au NMDA et le rôle de MND sur ces récepteurs, en utilisant l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA). Cet analogue au glutamate permet d'activer de manière sélective et spécifique les NMDARs. N'oubliant pas que les NMDARs sont impliqués dans la plasticité synaptique (Hunt et Castillo, 2012), la mémoire et l'apprentissage olfactif (Xia *et al.*, 2005 ; Franchini *et al.*, 2019) et potentiellement dans l'agressivité (Zwarts *et al.*, 2011),

si MND intervient dans le fonctionnement des NMDARs, il est fort probable que MND puisse avoir une implication dans ces processus.

Nous avons commencé par déterminer la concentration de NMDA qui permet une activation des KCa/β par imagerie calcique fonctionnelle. L'activité calcique des CPs est significativement plus importante en présence de 10 mM de NMDA (Fig.R51). Nous avons donc choisi d'utiliser cette concentration optimale pour la suite des tests. Cette concentration est du même ordre de grandeur que d'autres études utilisant le NMDA chez la drosophile (Xia *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2022).

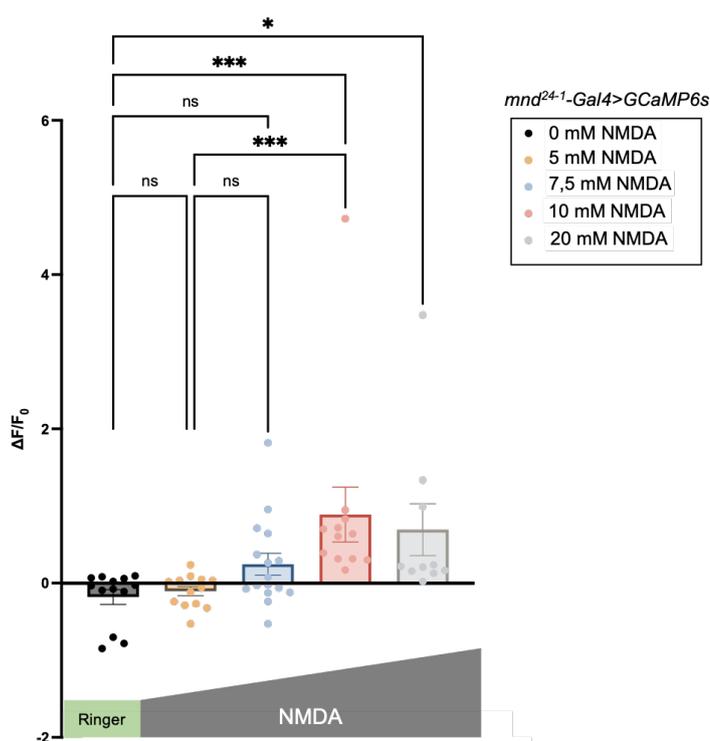


Fig. R51 : Le NMDA active les KCa/β .

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux $mnd^{24-1}-Gal4>UAS-GCaMP6s$ en présence de Ringer (noir, $n=13$) ou de solutions de NMDA de concentration croissante : 5mM (jaune, $n=13$), 7,5mM (bleu, $n=16$), 10 mM (rose, $n=12$) et 20mM (gris, $n=10$). L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm SEM$ des lobes des CPs pour chaque condition. Chaque point représente une donnée individuelle. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé. ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$. $n=10$ à 16 lobes.

Afin de s'assurer que la réponse des CPs au NMDA est bien spécifique des NMDARs, j'ai testé le NMDA à 10 mM en présence de 20 mM de $MgCl_2$. Le Mg^{2+} est connu pour être un ion bloquant le fonctionnement des récepteurs au NMDA (Xia *et al.*, 2005 ; Song *et al.*, 2017). En présence de cet ion, aucune activation des CPs n'est observée après addition de NMDA (Fig.R52). Ce résultat démontre que la réponse des CPs est bien induite par l'activation spécifique des NMDARs par le NMDA.

Cette réponse calcique observée des CPs en réponse au NMDA peut être générée soit de manière indirecte, par des neurones afférents aux CPs exprimant des NMDARs, soit de manière directe, par fixation du NMDA sur les NMDARs présents au sein des CPs. Pour déterminer si l'action observée du NMDA est directe ou indirecte sur les CPs, les récepteurs au NMDA ont été dérégulés dans les CPs par ARNi (*mnd²⁴⁻¹-Gal4*). Nous avons inhibé *NmdaR1* ou *NmdaR2* ou les deux sous-unités en même temps dans les KC α / β (Fig.R52).

La réponse calcique au NMDA des KCs est abolie lorsque l'expression de *NmdaR1* ou *NmdaR2* ou *NmdaR1* & *NmdaR2* est altérée par RNAi (Fig.R52). Ainsi, les CPs sont directement activables par le NMDA via les NMDARs présents au niveau des KC α / β qui expriment *mnd²⁴⁻¹*.

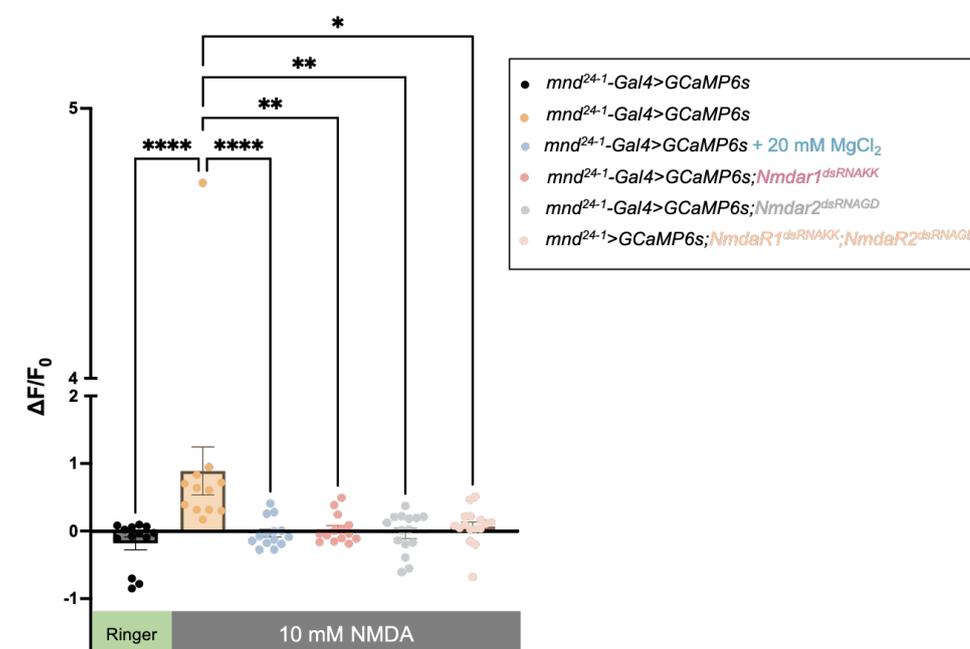


Fig. R52 : Les KC α / β sont directement activées par le NMDA via les NMDARs.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux témoins (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s*) en présence de Ringer (noir ; n=13) ou de 10 mM de NMDA (jaune, n=11), ou 20 mM de MgCl₂ + 10 mM de NMDA (bleu, n=14) ou de 10 mM NMDA sur des cerveaux dont les récepteurs au NMDA ont été dérégulés. La sous-unité NMDAR1 : cerveaux *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR1^{dsRNAKK}* (rose, n=14) ; la sous-unité NMDAR2 : *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR2^{dsRNAGD}* (gris, n=15) ; Les deux sous-unité simultanément NMDAR1&NMDAR2 : *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;NmdaR1^{dsRNAKK};NmdaR2^{dsRNAGD}* (beige, n=16)). L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm SEM$ des lobes des CPs pour chaque condition. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s* après application de 10 mM de NMDA, et chaque condition *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;RNAi*. ns : non significatif ; * : p<0,05 ; ** : p<0,001 ; *** : p<0,0001. n=11 à 16 lobes.

Le clustering des NMDARs semble pouvoir être modulé indirectement par HOMER (Diagana *et al.*, 2002) et HOMER peut interagir avec mGluR (Ly *et al.*, 2020). Des analyses de coexpression réalisées avec Scope montrent une coexpression de *mnd* et *homer* dans certaines cellules du cerveau (Fig.R53). Nous avons voulu savoir si la dérégulation de ces deux protéines (mGluR et HOMER) peut impacter la réponse des CPs au NMDA. De plus, nous avons aussi voulu déterminer si les différents récepteurs au glutamate présents dans les CPs autres que les NMDARs pouvaient avoir une incidence sur la réponse des CPs au NMDA. Nous avons donc dérégulé par ARNi chacun des différents RGlus dans les cellules KCa/β *mnd*²⁴⁻¹ positives (Fig.R54).

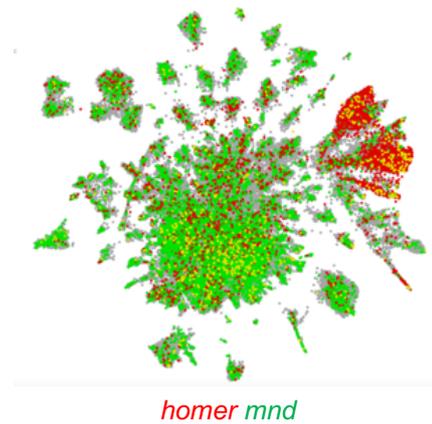


Fig. R53 : *mnd* et *homer* sont communément exprimés dans des cellules du cerveau adulte.

Expression de *mnd* en rouge, *homer* en vert et leur coexpression dans une cellule est représentée par du jaune. (Analyses avec l'outil Scope).

La réponse calcique des KCs exprimant la construction *KaiR1D*^{dsRNA} ou *mGluR*^{dsRNA} ou *GluCl α* ^{dsRNA} ou *homer*^{dsRNA} n'est pas modifiée comparée à celle des témoins après application de 10 mM de NMDA (Fig.R54). L'expression de ces constructions ne semble pas impacter la réponse des KCs au NMDA, pour tous les génotypes. Ainsi, la dérégulation de ces récepteurs dans les CPs ne modifie pas la capacité des KCs à répondre au NMDA. Cela suggère que ces récepteurs n'ont pas d'impact sur le fonctionnement ou le clustering des NMDARs au sein des CPs. Ainsi, HOMER ne semble pas impliqué dans une possible stabilisation des complexes NMDARs à la membrane plasmique des KCs. De plus, cela montre que l'expression d'une construction ARNi n'a pas d'incidence sur la capacité des KCs à répondre au NMDA.

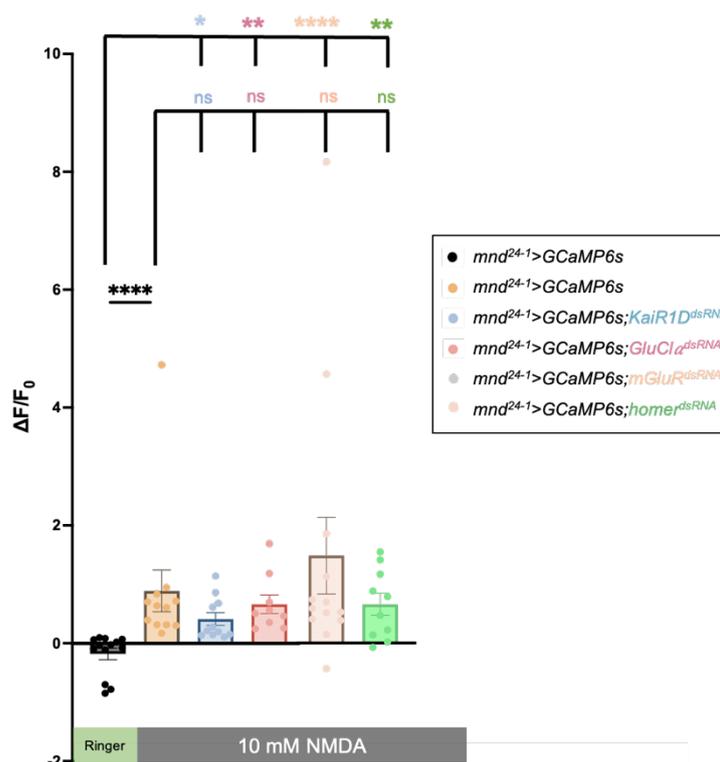


Fig. R54 : La dérégulation de différents *RGlus* et *homer* dans les *KCa/β* n'impacte pas leur capacité à répondre au NMDA.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux témoin *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s en présence de Ringer (noir ; n=13) ou 10 mM de NMDA (jaune, n=11), ou après application de 10 mM sur des cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;*KaiR1D*^{dsRNA} (bleu, n=11), des cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;*GluClα*^{dsRNA} (rose, n=9), des cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;*mGluR*^{dsRNA} (beige, n=11) et des cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;*homer*^{dsRNA} (vert, n=10). L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0$, \pm SEM des lobes des CPs pour chaque condition. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s après application de 10 mM de NMDA, et chaque condition *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s;RNA. ns : non significatif**** : $p < 0.0001$. n=9 à 13 lobes.

Ainsi, les *KCa/β* exprimant *mnd* et les *NmdaRs* sont directement activables par 10 mM de NMDA. Cette activité des NMDARs au sein des CPs n'est pas modulée par d'autres récepteurs au glutamate exprimés dans ces *KCa/β* comme *KaiR1D*, *mGluR* ou *GluClα*. De plus, il semble que HOMER n'a pas de rôle particulier dans l'activité des NMDARs dans les CPs.

C. Implication de MND dans la réponse au NMDA

Mon intérêt principal se porte sur la fonction de MND, dont nous avons montré son rôle clef dans l'activité des CPs en réponse au glutamate (Fig.R17). Pouvant passer par de multiples *RGlus*, nous venons de mettre en évidence une voie d'activation

dépendante des NMDARs au sein des $KC\alpha/\beta$ (Fig.R52). Nous avons donc voulu savoir si cette activité des CPs en réponse au NMDA est dépendante de MND.

Pour déterminer si MND intervient dans la voie d'activation des $KC\alpha/\beta$ via les NMDARs, des expériences d'imagerie calcique ont été réalisées sur des cerveaux dont *mnd* est dérégulé par deux ARNi différents dans les CPs (*mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNA^{AKk}} (VDRC) et *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNA}(Bloomington) (Fig.55). Les résultats montrent une absence de la réponse calcique des $KC\alpha/\beta$ au NMDA quand *mnd* est dérégulé par ces deux ARNi. Ainsi, nous montrons que le NMDA se fixe sur les NMDARs des $KC\alpha/\beta$ et cette voie d'activation est dépendante de la présence de MND dans les CPs. Il semble donc que l'implication de MND dans la réponse des CPs au glutamate passe, du moins en partie, par les NMDARs.

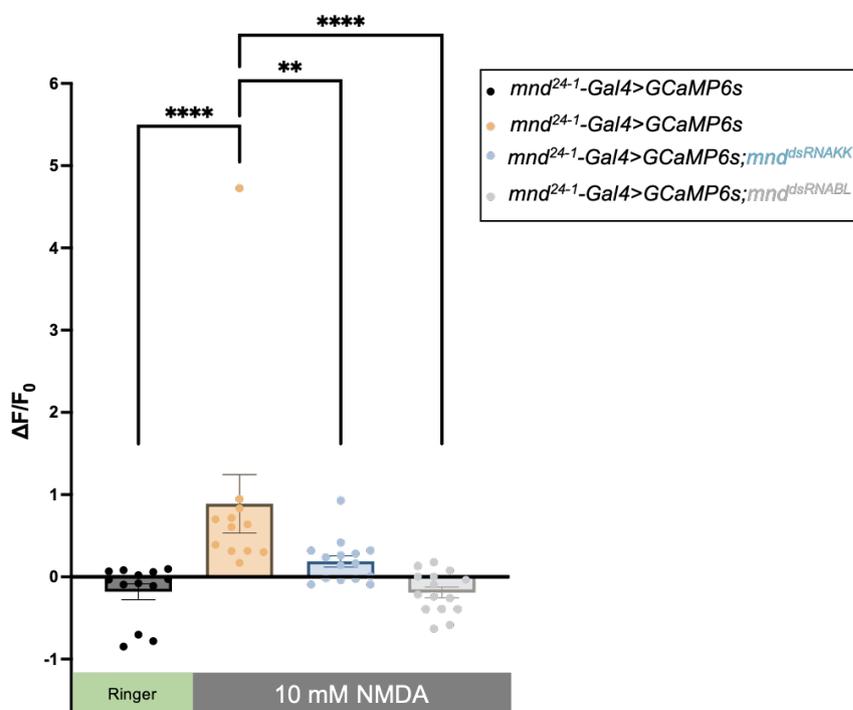


Fig. R55 : MND est nécessaire aux $KC\alpha/\beta$ pour répondre au NMDA.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s en présence de Ringer (noir ; n=13) ou 10 mM de NMDA (jaune, n=12), ou de cerveaux dont *mnd* a été dérégulé (cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNA^{AKk}} (bleu, n=15) ou cerveaux *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-*mnd*^{dsRNA^{ABL}} (gris, n=15)). Chaque point représente une donnée individuelle. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0$, \pm SEM des lobes des CPs pour chaque condition. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition témoin *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s après application de 10 mM de NMDA, et chaque condition *mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;RNA. **: $p < 0,01$ ****: $p < 0.0001$. n=12 à 15 lobes.

La D-sérine est un co-activateur des NMDARs (Shleper *et al.*, 2005 ; Wolosker et Balu, 2020 ; Park *et al.*, 2022). La D-sérine est synthétisée par les cellules gliales astrocytaires et agit comme un gliotransmetteur (Park *et al.*, 2022). Pour confirmer la

présence des NMDARs au sein des CPs, nous avons testé l'action de la D-sérine sur les cerveaux en imagerie fonctionnelle calcique (Fig.R56). Nous avons observé que la D-sérine active les cellules KCa/β $mnd^{24-1-Gal4}$ positives ($\Delta F/F_0=0,55\pm 0,15$) comparé au Ringer ($\Delta F/F_0=-0,22\pm 0,10$), ce qui suggère que la D-sérine peut activer les récepteurs au NMDA présents dans les CPs. Afin de confirmer l'implication de MND dans la réponse des CPs au glutamate via les NMDARs, nous avons dérégulé mnd et testé l'activité des CPs en réponse à la D-sérine (Fig.R56). Comme pour le glutamate, l'inactivation de mnd dans ces cellules bloque l'activité des CPs ($\Delta F/F_0=0,05\pm 0,06$) en réponse à la D-sérine. Ce qui renforce l'idée que MND pourrait réguler l'activité des CPs dépendante des NMDARs.

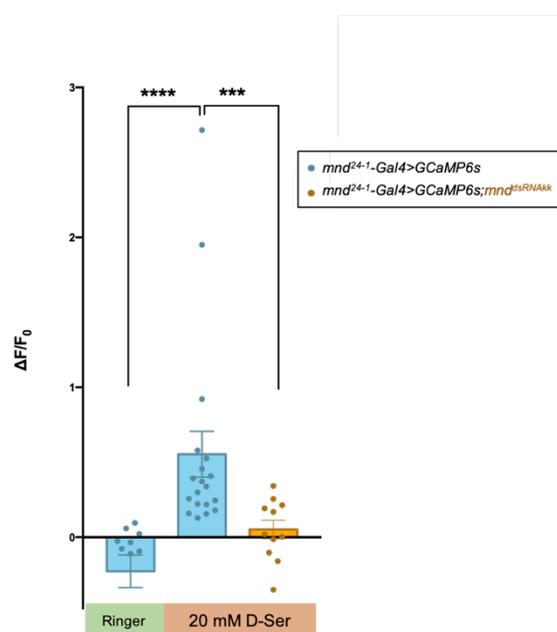


Fig. R56 : L'activation des KCa/β par la D-sérine est dépendante de MND.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs $mnd^{24-1-Gal4}>UAS-GCaMP6s$ en présence de Ringer (bleu, $n=8$) ou après application de 20 mM D-Sérine chez des cerveaux témoins $mnd^{24-1-Gal4}>UAS-GCaMP6s$ (bleu, $n=17$) ou des cerveaux dont mnd a été dérégulé $mnd^{24-1-Gal4}>UAS-GCaMP6s;UAS-mnd^{dsRN\Delta k}$ (orange, $n=11$). Chaque point représente une donnée individuelle. L'intensité maximale de GFP est calculée avec les 5 images des lobes obtenues autour du pic d'activité des lobes : moyenne ratio $\Delta F/F_0 \pm SEM$ des lobes des CPs pour chaque condition. Un test de Mann-Whitney a été réalisé entre la condition témoin $mnd^{24-1-Gal4}>UAS-GCaMP6s$ et la condition $mnd^{24-1-Gal4}>UAS-GCaMP6s;UAS-mnd^{dsRN\Delta k}$. *** : $p<0.001$; **** : $p<0.0001$. $n=8$ à 17 lobes.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que des neurones KCa/β sont capables de répondre au glutamate en partie grâce aux récepteurs aux NMDARs. L'activité NMDARs dépendante des KCa/β est contrôlée par une chaîne légère de transporteur d'acides aminés, MND. Cette voie d'activation des KCa/β impliquant MND et les NMDARs, mise en évidence par imagerie calcique, montre l'importance de MND dans le fonctionnement neuronal des CPs et donc potentiellement dans les comportements régulés par les CPs, comme l'agressivité.

3. Glutamate et les KC α / β dans le comportement d'agressivité.

Chez la drosophile, *NmdaR1* a été identifié comme régulateur du comportement d'agressivité (Zwarts *et al.*, 2011) et les corps pédonculés jouent un rôle prépondérant dans la régulation de ce comportement (Baier *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2009 ; Chouhan *et al.*, 2017). Nous avons donc cherché à savoir si le glutamate via les NMDARs au sein des CPs était impliqué dans le contrôle de l'agressivité. Pour cela, l'expression de *NmdaR1* a été dérégulée par ARNi dans toutes les KCs grâce à un driver *VT30559-Gal4* et le comportement d'agressivité a été analysé (Fig.R57).

Les différents indicateurs de l'agressivité ne semblent pas être modifiés par la dérégulation de *NmdaR1* dans les CPs, suggérant que l'activation par le glutamate via les NMDARs/MND des KC α / β ne participe pas au contrôle du comportement d'agressivité territoriale inter-mâles (Fig.R57). Des études préliminaires semblent montrer que *NmdaR1* n'est également pas nécessaire dans les neurones des CPs à la régulation sociale de l'agressivité (Fig.R58).

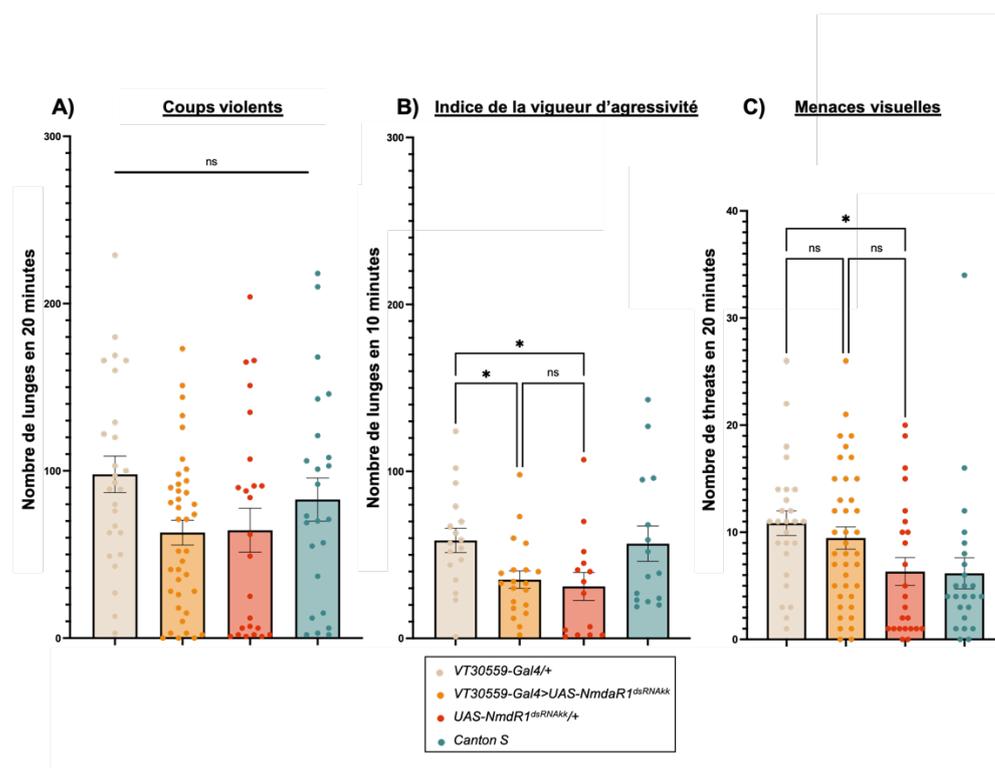


Fig. R57 : La dérégulation de *NmdaR1* dans les CPs n'impacterait pas le comportement d'agressivité.

A) Nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) L'indice de vigueur d'agressivité (nombre de lunges comptabilisés sur 10 minutes après le premier lunge). C) Nombre de threats comptabilisés sur 20 minutes. Les différents indicateurs d'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=26), UAS-NmdaR1^{dsRNA}/+ (rouge ; n=24) et Canton S (bleu ; n=24) et d'individus où *NmdaR1* a été invalidé dans les CPs (VT30559-Gal4>UAS-NmdaR1^{dsRNA} (orange ; n=39)). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif ; * : p < 0,05.

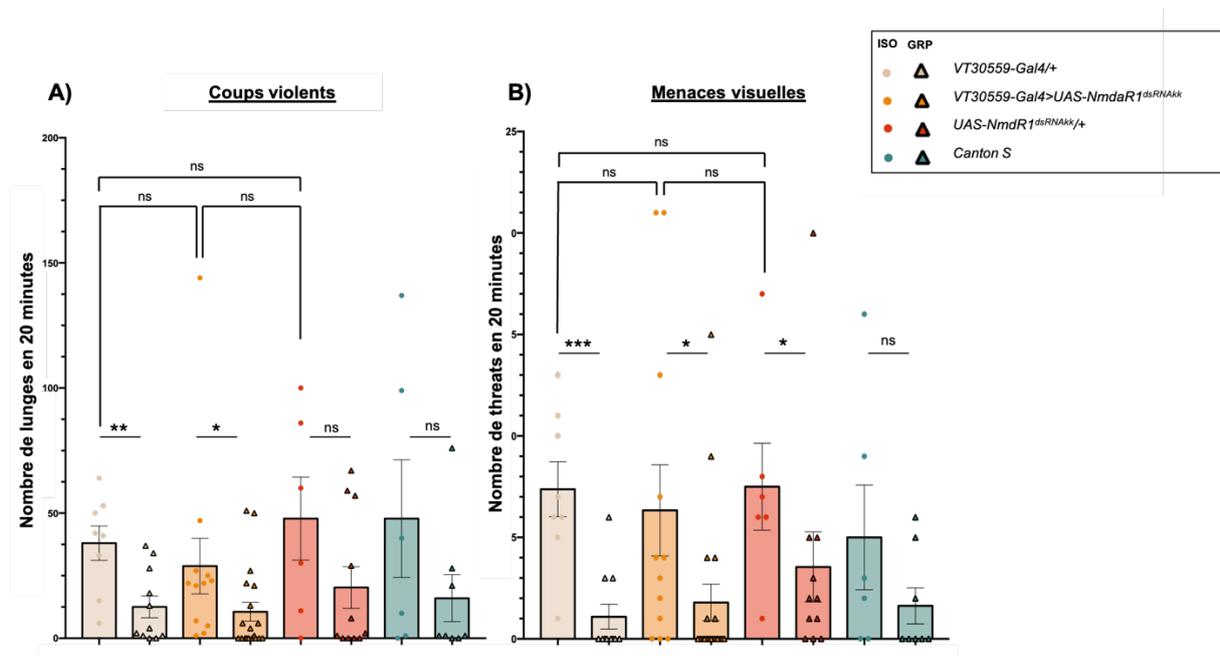


Fig. R58 : *NmdaR1* dans les CPs n’interviendrait pas dans la modulation sociale du comportement d’agressivité.

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) Le nombre de threats comptabilisés sur 20 minutes. Les différents indicateurs d’agressivité ont été mesurés à partir d’individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; isolés $n=8$, groupés $n=11$), UAS-*NmdaR1*^{dsRNA^{AKk}}/+ (rouge ; isolés $n=6$, groupés $n=11$) et Canton S (bleu ; isolés $n=6$, groupés $n=8$) et d’individus où *NmdaR1* a été invalidé dans les CPs VT30559-Gal4>UAS-*NmdaR1*^{dsRNA^{AKk}} (jaune ; isolés $n=12$, groupés $n=17$). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés entre les génotypes d’une même condition : « isolé » ou « groupés ». Seul le test de la condition « isolé » est montré. Le test de la condition « groupés » donne des résultats similaires. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre condition « isolé » et « groupés » d’un même génotype . ns : non significatif ; * : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$.

Il est connu que l’isolement social exacerbe les comportements agressifs, ce que nous avons pu observer expérimentalement (Fig.R24). Nous avons voulu savoir si cette régulation environnementale du comportement d’agressivité pouvait être le reflet d’une différence de réponse des CPs au glutamate via les NMDARs. C’est pourquoi nous nous sommes intéressés à l’activité des CPs en réponse au NMDA en fonction de la condition d’élevage des individus. Nous avons alors analysé la réponse au NMDA des $KC\alpha/\beta$ d’individus isolés et d’individus groupés, par imagerie calcique (Fig.R59A).

Les cerveaux (*mnd*²⁴⁻¹-Gal4>UAS-*GCaMP6s*) issus de mâles élevés en groupe de 6 montrent une activité calcique des CPs ($\Delta F/F_0=0,08\pm 0,06$) statistiquement plus faible en réponse à 10 mM de NMDA que celle observée chez des mâles isolés ($\Delta F/F_0=0,88\pm 0,35$) (Fig.R59A). Cette différence de réponse suggère que les KCs d’individus groupés sont moins sensibles aux signaux glutamatergiques reçus par les KCs via les NMDARs. Cela ne semble pas être dû à une différence significative de l’expression de *NmdaR1* dans les têtes de drosophiles groupés comparés aux

drosophiles isolées (Fig.R59B). Des quantifications en western-blot des protéines NMDARs permettraient peut-être d'expliquer la différence observée.

Cette différence d'activité des CPs entre la condition « isolé » et la condition « groupés » ne se retrouve pas chez les femelles. Les CPs des femelles présentent une réponse au NMDA similaire en fonction de leur condition d'élevage, isolée ($\Delta F/F_0=0,29\pm 0,11$) et groupées ($\Delta F/F_0=0,10\pm 0,11$) (Fig.R59A). Ce dimorphisme sexuel de la réponse des CPs au NMDA en fonction des conditions d'élevage, « isolé » versus « groupés », suggère qu'un facteur environnemental social présent uniquement chez les mâles impacte le fonctionnement des corps pédonculés.

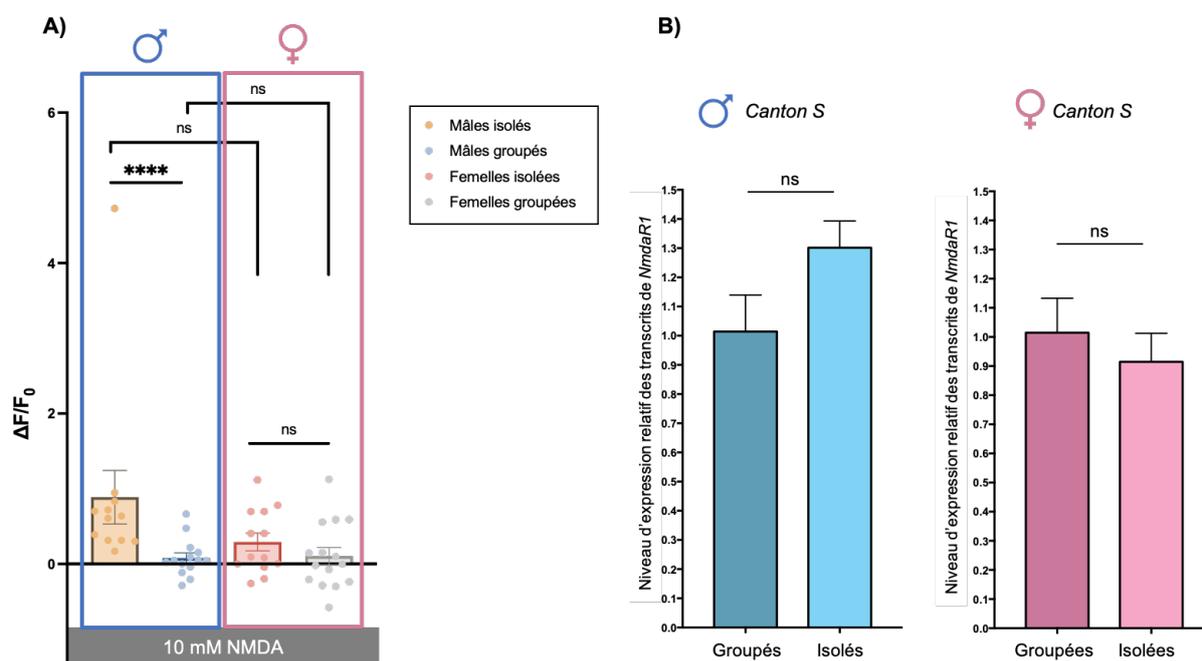


Fig. R59 : Environnement social et dimorphisme sexuel sur la réponse des CPs au NMDA et l'expression de *NmdaR1*.

A) Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux *mnd²⁺¹-Gal4>UAS-GCaMP6s*, soit de mâles isolés (en jaune $n=12$) ; de mâles groupés (bleu ; $n=14$) ; de femelles isolées (rose ; $n=13$), ou de femelles groupées (gris ; $n=15$) après application de 10 mM de NMDA. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition « isolé » et celle « groupés » de chaque sexe, et entre les sexes de même condition d'élevage. ns : non significatif ; **** : $p < 0.0001$. B) Niveau d'expression relative de *NmdaR1* chez les mâles groupés et isolés (bleu) et chez les femelles groupées et isolées (rose). Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition « isolé » et celle « groupés » de chaque sexe. ns : non significatif

Afin de déterminer l'origine de cette différence de réponse des CPs au NMDA, nous avons premièrement cherché à savoir si cet élément est présent chez toutes les drosophiles ou présent chez un sexe en particulier. Pour cela nous avons groupé un mâle avec 5 femelles et avons observé la réponse des CPs au NMDA (Fig.R60). Les mâles groupés avec 5 femelles présentent le même phénotype d'activation des CPs ($\Delta F/F_0=0,86\pm 0,35$) que des mâles isolés ($\Delta F/F_0=0,88\pm 0,35$). Cela signifie que la réduction

de l'activité des CPs observés lorsque les mâles sont groupés entre eux par 6 est spécifique de l'interaction mâle-mâle. Ainsi, l'activité des CPs des mâles ne semble pas dépendre de la présence des femelles (Fig.R60).

Les interactions mâles-mâles sont nombreuses et passent principalement par la détection de phéromones comme le 11-*cis*-Vaccenyl Acétate (cVA) et le (z)-7-tricosène (7T). Le cVA est une phéromone mâle qui régule, via différents récepteurs, les comportements d'agrégation ou d'éloignement au sein d'un groupe, de parade sexuelle et d'agressivité (Cf. Partie 4 « Introduction 1 »). Afin de voir si cette phéromone spécifique peut moduler l'activité des CPs au NMDA, nous avons testé l'effet d'une exposition chronique au cVA (1 μ M), mimant les interactions mâle-mâles chez des mâles isolés, sur l'activité des CPs (Fig. R60). Nous observons que des mâles isolés exposés à cette phéromone ont une activité des CPs ($\Delta F/F_0=0,17\pm 0,14$) comparable aux mâles groupés ($\Delta F/F_0=0,08\pm 0,06$) et significativement différente des mâles isolés ($\Delta F/F_0=0,88\pm 0,35$) (Fig.R60). Ainsi, l'exposition chronique au cVA phénocopie l'effet des interactions mâles-mâles sur l'activité des CPs. Ce serait donc cette phéromone qui potentiellement modulerait à la baisse la voie NMDARs dans les CPs. Si c'est le cas, sachant que la réponse des CPs au NMDA est MND dépendante (Fig.R55), le fait de surexprimer *mind* dans un contexte groupé (donc avec présence de cVA du groupe) devrait permettre de retrouver l'activité des CPs des mâles isolés. C'est ce que nous observons (Fig.R61). Ce qui suggère que les interactions mâles-mâles liées au cVA inhibent une voie MND dépendante induisant une abolition de la réponse des CPs au glutamate via les NMDARs.

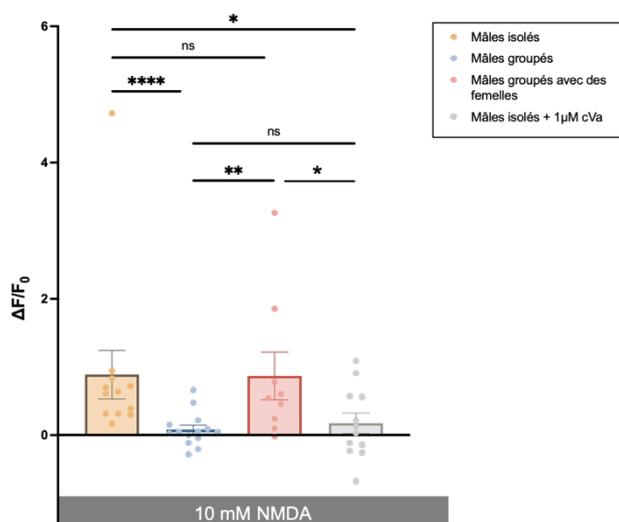


Fig. R60 : La réponse des CPs au NMDA semble être modulée par la détection chronique de cVA.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs, après application de 10 mM de NMDA, de cerveaux mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s de mâles isolés (en jaune n=12); de mâles groupés (bleu ; n=14); de mâles groupés avec des femelles (rose ; n=9), ou de mâles isolés exposés à 1 μ M de cVA de manière chronique (gris ; n=12). Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre chaque condition. ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; **** : $p < 0.0001$.

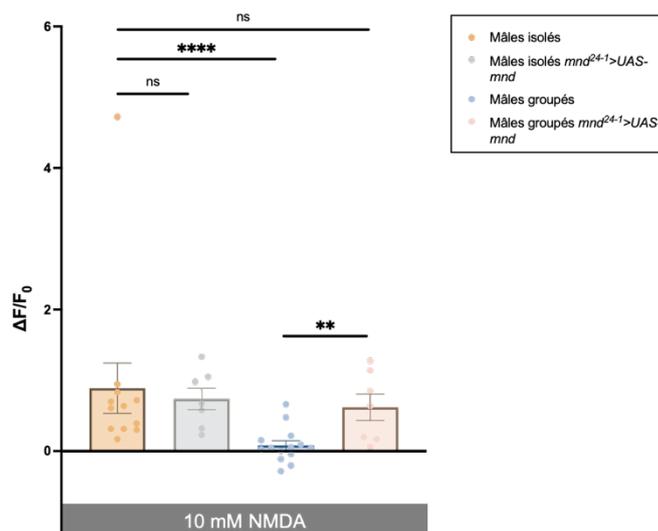


Fig. R61 : La surexpression de mnd dans les $KC\alpha/\beta$ et γ phénocopie l'effet de l'isolement social sur la réponse des CPs au NMDA.

Les histogrammes représentent l'activité maximale observée autour du pic de la réponse des lobes des CPs de cerveaux après application de 10 mM NMDA, de cerveaux mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s de mâles isolés (en jaune n=11); de mâles groupés (bleu ; n=14) ou de cerveaux mnd^{24-1} -Gal4>UAS-GCaMP6s;UAS- mnd de mâles isolés (gris, n=7) ou de mâles groupés (beige ; n=7). Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre chaque condition. ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; **** : $p < 0.0001$.

De manière étonnante, nous n'avons pas détecté de modulation de l'agressivité lors de la dérégulation de mnd ou de $Nmdar1$ dans toutes les KCs. Il est possible que le glutamate active des RGlus autres que les NMDARs afin de moduler l'agressivité. En effet, chez les mammifères les récepteurs métabotropiques sont impliqués dans les comportements sociaux et l'agressivité (Zoicas et Kornhuber, 2019). Je me suis donc intéressée à mGluR.

Nous avons montré précédemment que le récepteur métabotropique au glutamate, $mGluR$ est coexprimé avec mnd^{24-1} dans les $KC\alpha/\beta$ et γ (Fig.R45). Nous nous sommes interrogés sur l'implication d'une voie mGluR dépendante au sein des CPs dans la régulation de l'agressivité. Nous avons commencé par déréguler $mGluR$ dans tous les neurones des CPs ($VT30559$ -Gal4) et observé le comportement d'agressivité.

La moyenne du nombre de lunges en 20 minutes est similaire entre les génotypes, de même que l'indice de la vigueur d'agressivité (Fig.R62). Le nombre de threats (menaces visuelles) est similaire entre les génotypes ainsi que la latence à initier

un comportement agressif (Fig.R63). Ces résultats suggèrent que *mGluR* dans les CPs n'est pas impliqué dans la mise en place de comportements territoriaux agressifs.

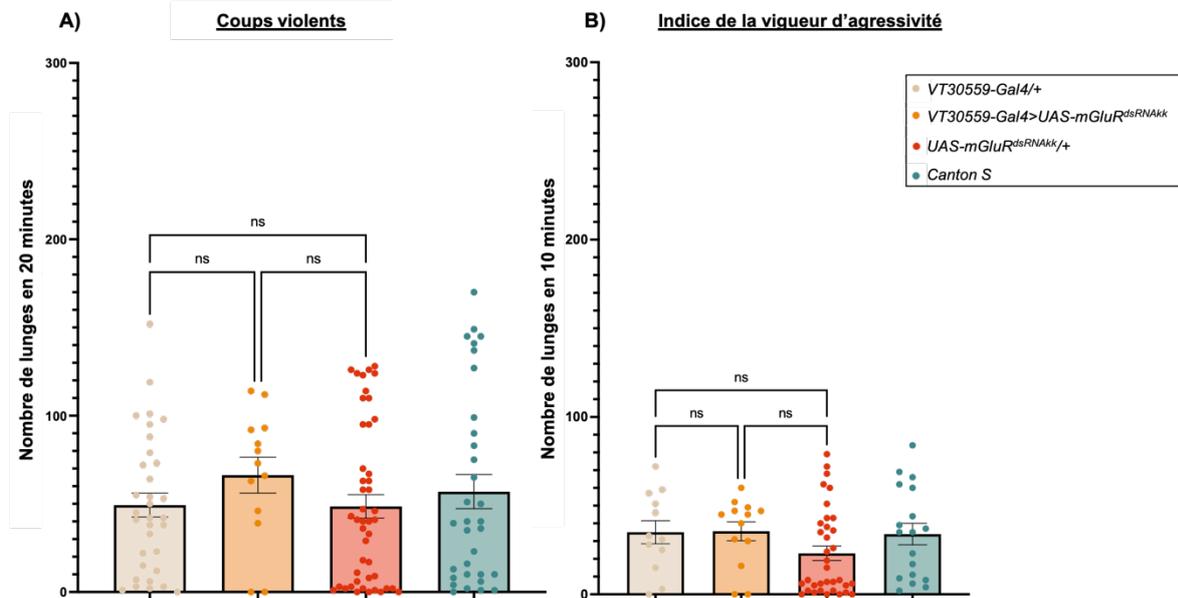


Fig. R62 : *mGluR* dans les CPs n'interviendrait pas dans le comportement d'agressivité (1).

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) L'indice de vigueur d'agressivité (le nombre de lunges comptabilisés sur 10 minutes après le premier lunge). Ces indicateurs de l'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=12), UAS-mGluR^{dsRNAkk}/+ (rouge ; n=35) et Canton S (bleu ; n=18) et d'individus où *mGluR* a été invalidé dans les CPs. VT30559-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNAkk} (jaune ; n=13). Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns: non significatif.

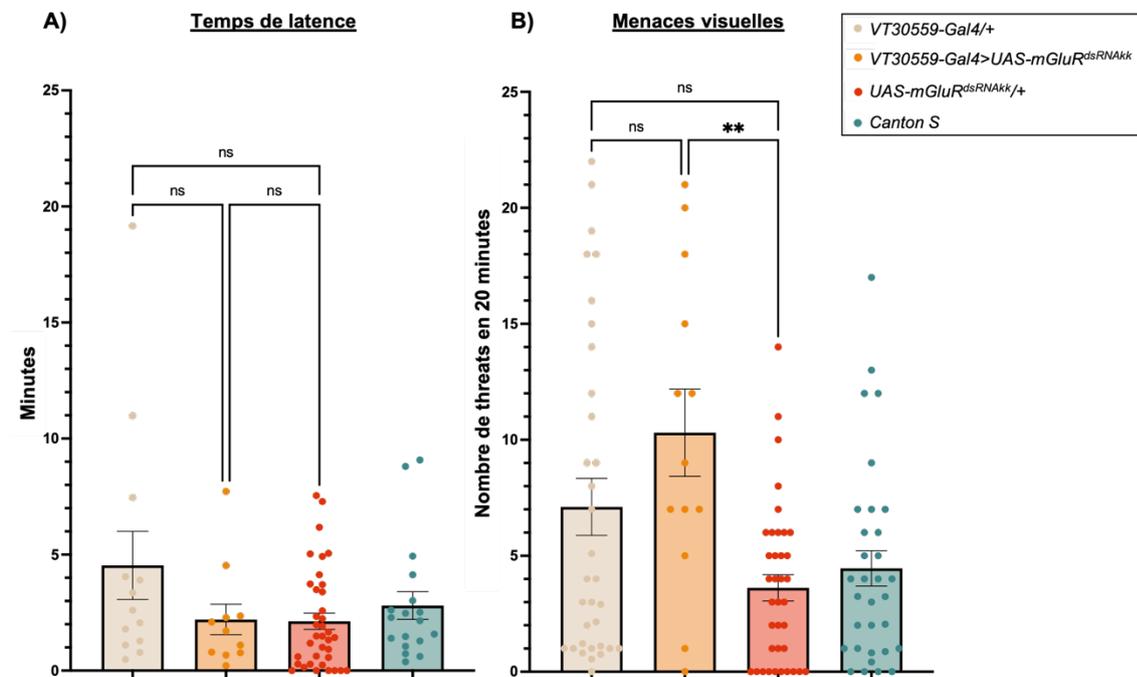


Fig. R63 : *mGluR* dans les CPs n'interviendrait pas dans le comportement d'agressivité (2).

A) Le temps de latence. B) Le nombre de menaces visuelles (nombre de threats comptabilisés sur 20 minutes). Les différents indicateurs d'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins VT30559-Gal4/+ (blanc ; n=13-

33), *UAS-mGluR^{dsRNAkk}/+* (rouge ; n=37) et *Canton S* (bleu ; n=18-32) et d'individus où *mGluR* a été invalidé dans les CPs *VT30559-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNAkk}* (jaune ; n=11-13). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif ; ** : $p < 0,01$.

Comme l'agressivité est modulée par les interactions sociales et que nous montrons que l'activation des CPs en réponse à des signaux glutamatergique via les NMDARs est modulable par les interactions mâles-mâles (Fig.R59), nous nous sommes demandé si un autre RGlut peut être mis en jeu dans la régulation sociale de l'agressivité. Pour cela nous avons analysé le comportement d'agressivité entre mâles *VT30559-Gal4>mGluR^{dsRNAkk}* isolés et groupés (Fig.R64).

Il semble que le nombre de lunges et l'indice de vigueur d'agressivité est diminuée quand les individus sont groupés et cela pour tous les génotypes (Fig.R64), indiquant que *mGluR* dans les CPs ne semble pas jouer de rôle dans le mécanisme de régulation de l'agressivité par l'environnement social.

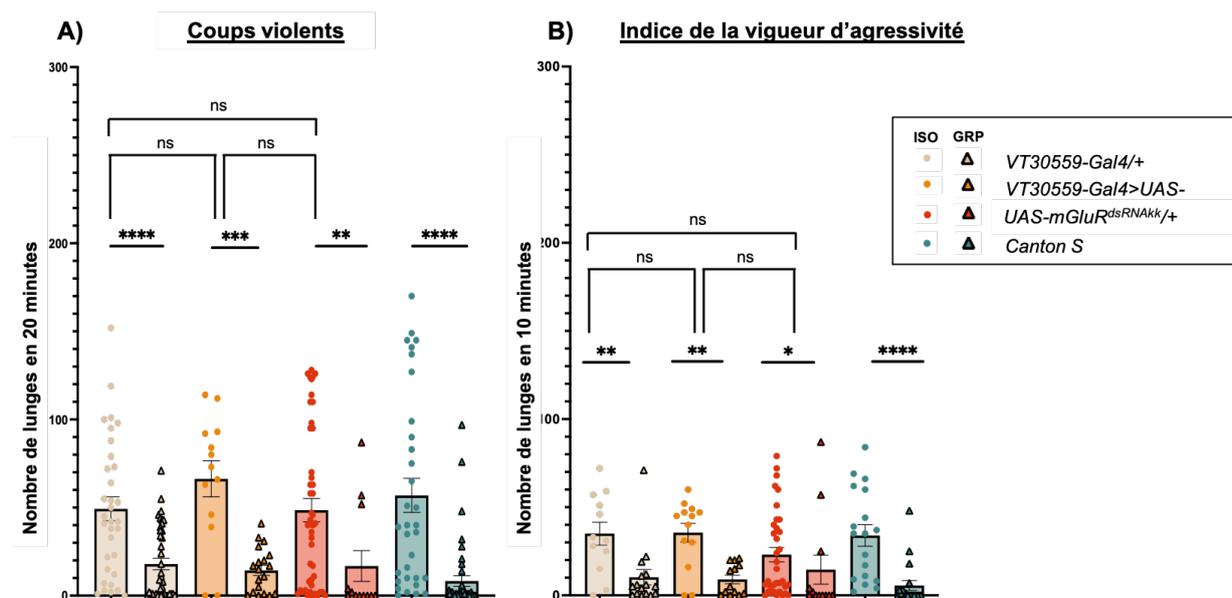


Fig. R64 : *mGluR* dans les CPs n'interviendrait pas dans la modulation sociale du comportement d'agressivité.

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) L'indice de vigueur d'agressivité (le nombre de lunges comptabilisés sur 10 minutes après le premier lunge). Les différents indicateurs d'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins *VT30559-Gal4/+* (blanc ; isolés n=33, groupés n=39), *UAS-mGluR^{dsRNAkk}/+* (rouge ; isolés n=46 et groupés n=12) et *Canton S* (bleu ; isolés n=32 et groupés n=45) et d'individus où *mGluR* a été invalidé dans les CPs *VT30559-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNAkk}* (jaune ; isolés n=13 et groupés n=19)). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés entre la condition « isolé » et « groupés » pour chaque génotype. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés entre les différents génotypes au sein d'une condition d'élevage, « isolé » ou « groupés ». ns : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$.

Sachant que les lobes des CPs semblent pouvoir être antagonistes les uns par rapport aux autres (Owald *et al.*, 2015 ; Sun *et al.*, 2018), nous avons testé la

dérégulation de *mGluR* uniquement dans KCa/β et γ ($mnd^{24-1}-Gal4$) et observé les comportements agressifs (Fig.R65 ; Fig.R66).

Dans ces conditions, nous observons une augmentation significative du nombre moyen de lunges donnés en 20 minutes, et une augmentation de l'indice de vigueur d'agressivité chez les individus $mnd^{24-1}>mGluR^{dsRNAkk}$ comparés aux individus des lignées témoins $mnd^{24-1}-Gal4/+$ et $mGluR^{dsRNAkk}/+$ (Fig.R65). Le temps avant le premier lunge (le temps de latence) n'est significativement pas différentes entre les groupes (Fig.R66A) ce qui suggère que *mGluR* n'intervient pas dans la « motivation » du comportement d'agressivité territoriale inter-mâles. Une différence du nombre de threats est observée entre les individus $mnd^{24-1}>mGluR^{dsRNAkk}$ et les individus $mGluR^{dsRNAkk}/+$ mais aucune différence statistique n'est observée entre les individus $mnd^{24-1}>mGluR^{dsRNAkk}$ et les individus $mnd^{24-1}-Gal4/+$ (Fig.R66B). Ce qui suggère que *mGluR* n'est pas impliqué dans la modulation des menaces visuelles.

Il semble que dans ces conditions *mGluR* est nécessaire au contrôle de l'agressivité, notamment pour les menaces physiques (Fig.R65) mais pas pour les menaces visuelles (Fig.R66B). *mGluR* au sein des CPs exprimant $mnd^{24-1}-Gal4$ semble avoir un rôle d'inhibiteur de l'agressivité.

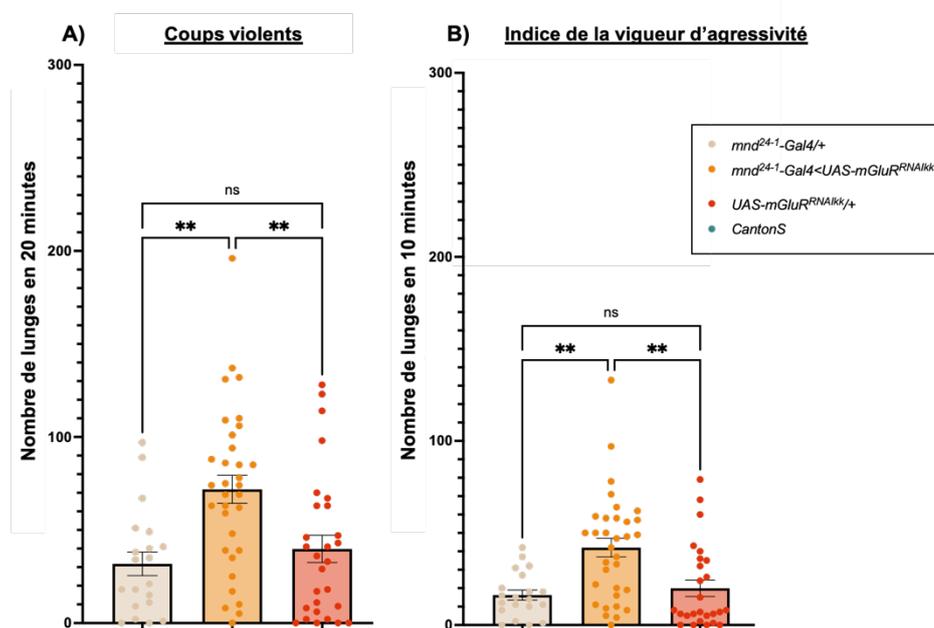


Fig. R65 : *mGluR* dans les KCa/β et γ semble inhiber l'agressivité physique.

A) Le nombre de lunges comptabilisés sur 20 minutes. B) Indice de vigueur d'agressivité (le nombre de lunges comptabilisés sur 10 minutes après le premier lunge). Les différents indicateurs d'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins $mnd^{24-1}-Gal4/+$ (blanc ; $n=20$), $UAS-mGluR^{dsRNAkk}/+$ (rouge ; $n=28$) et d'individus où *mGluR* a été dérégulé dans les KCa/β et γ ($mnd^{24-1}-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNAkk}$ (jaune ; $n=33$)). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif ; ** : $p<0,01$.

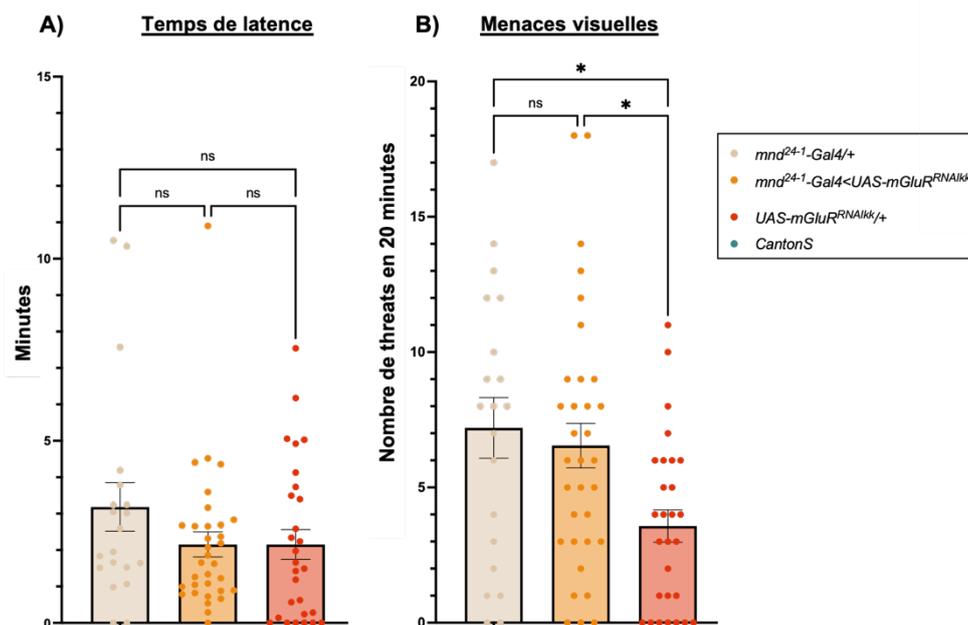


Fig. R66 : La dérégulation de *mGluR* dans les $KC\alpha/\beta$ et γ ne modifie pas le nombre de threats ni l'initiation du premier lunge.

A) Le temps de latence en minutes. B) Le nombre de threats comptabilisés sur 20 minutes. Les différents indicateurs d'agressivité ont été mesurés à partir d'individus témoins $mnd^{24-1}-Gal4/+$ (blanc ; $n=20$), $UAS-mGluR^{dsRNAkk}/+$ (rouge ; $n=28$) et d'individus où *mGluR* a été invalidé dans les $KC\alpha/\beta$ et γ $mnd^{24-1}-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNAkk}$ (jaune ; $n=33$). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés. ns : non significatif ; * : $p<0,05$.

Un des indices de la parade sexuelle, le nombre d'extensions d'aile, a également été analysé. Une différence de cet indice est observée entre les individus $mnd^{24-1}>mGluR^{dsRNAkk}$ et les individus $mnd^{24-1}-Gal4/+$ mais aucune différence statistique n'est observée entre les individus $mnd^{24-1}>mGluR^{dsRNAkk}$ et les individus $mGluR^{dsRNAkk}/+$. Cela suggère que *mGluR* n'est pas requis dans les KC exprimant mnd^{24-1} pour la régulation du comportement de parade sexuelle (Fig.R67).

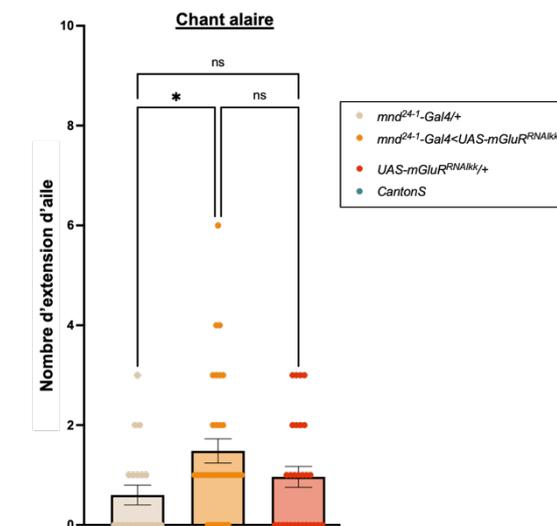


Fig. R67 : La dérégulation de *mGluR* dans les *KCα/β* et γ ne semble pas modifier la parade sexuelle.

Le nombre d'extensions d'aile comptabilisé sur 20 minutes. Cet indicateur de la parade a été mesuré à partir d'individus témoins *mnd²⁴⁻¹-Gal4/+* (blanc ; $n=20$), *UAS-mGluR^{dsRNA}/+* (rouge ; $n=28$) et d'individus où *mGluR* a été invalidé dans les *KCα/β* et γ *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-mGluR^{dsRNA}* (jaune ; $n=33$). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. Chaque point représente une donnée individuelle. Un test de Kruskal Wallis a été réalisé. ns : non significatif ; * : $p<0,05$.

Ainsi, il semble qu'une voie glutamatergique au sein des *KCα/β* et γ impliquant *mGluR* soit nécessaire à la flexibilité de stratégies d'agressivité, en inhibant l'agressivité physique (lunges) sans moduler l'agressivité visuelle (threats). Ces résultats suggèrent l'implication d'une voie glutamatergique via *mGluR* régulant l'activité des CPs et permettant l'adaptabilité des comportements agressifs.

Conclusions et discussions (partie 2)

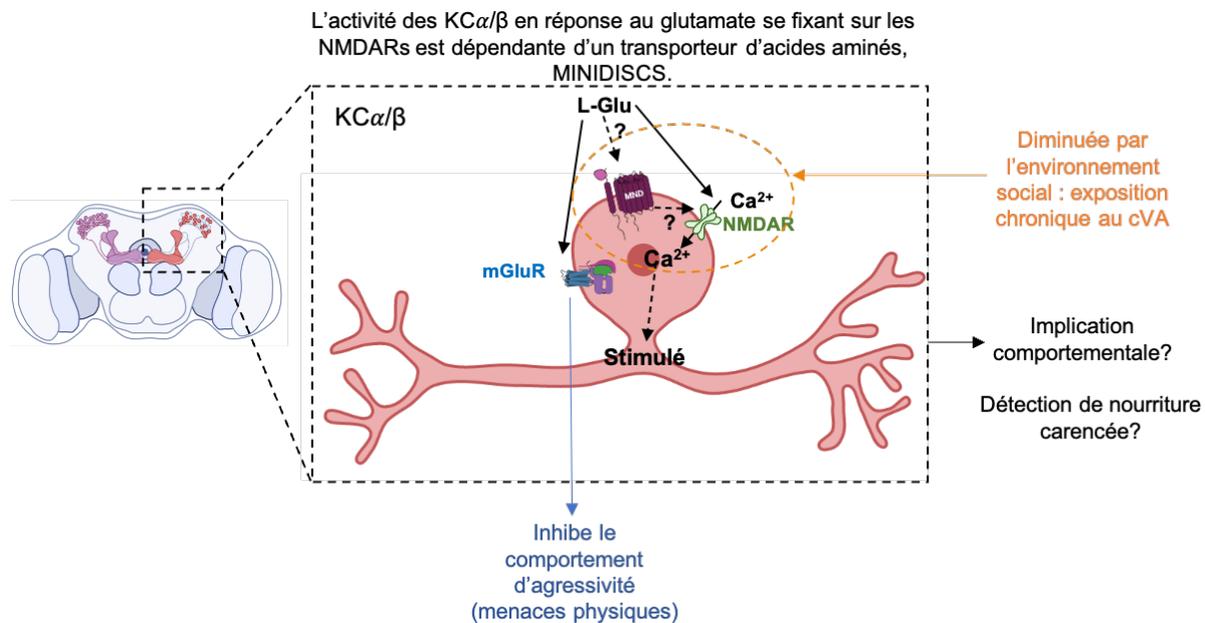


Fig. R68 : Schéma simplifié de l'activité des CPs en réponse au glutamate passant par une voie NMDARs et MND dépendante.

Les principaux résultats de cette deuxième partie sont schématisés par la figure R68. Nous montrons que la région régulatrice mnd^{24-1} de mnd et cinq récepteurs au glutamate ($NmdaR1$, $NmdaR2$, $KaiR1D$, $GluCl\alpha$, et $mGluR$) sont conjointement exprimés dans des neurones faisant partie des KCa/β . Dans les KCy , deux récepteurs au glutamate s'exprimant communément avec mnd^{24-1} ont été identifiés ($KaiR1D$ et $mGluR$). Par imagerie calcique, nous avons démontré que les KCa/β sont capables de répondre directement au glutamate via les NMDARs et que cette réponse est dépendante de MND. De plus, il semble que cette voie NMDARs/MND soit modulée par l'environnement social. En effet, nous mettons en évidence l'implication d'une phéromone mâle qu'est le cVA. Cette phéromone semble réduire la capacité des CPs à répondre au glutamate par la voie NMDARs/MND. De manière étonnante, l'implication de NMDAR1 n'a pas pu être mise en évidence au sein des CPs dans la régulation de l'agressivité, que ce soit chez les mâles isolés ou groupés. Parallèlement, des études préliminaires semblent montrer que $mGluR$ au sein des KCa/β et γ est impliqué dans l'inhibition des comportements agressifs physiques sans modifier les comportements agressifs visuelles. Ceci suggère une régulation fine de la stratégie d'agressivité par une voie glutamatergique dépendante de $mGluR$ au sein des KCa/β et γ .

Le transport de L-Glu au niveau des synapses glutamatergiques est finement contrôlé afin de permettre le passage du message nerveux. Il est possible que MND joue un rôle dans la localisation des NMDARs à la membrane au sein des CPs. En effet, il a été montré que JHI-21, un autre chaîne légère de LAT, contrôle le regroupement des iGluRs au niveau de la JNM (Ziegler *et al.*, 2018). Il est également possible que la voie intracellulaire activée par MND (la voie TOR via le transport de leucine) puisse être un signal d'inhibition du recyclage/remodelage des NMDARs au niveau de la membrane. Ainsi, dérégulé MND induirait une diminution du recrutement des NMDARs au niveau de la membrane, qui ne seraient alors plus assez nombreux pour permettre l'activation du neurone. Ainsi, MND pourrait potentiellement jouer un rôle dans le fonctionnement et/ou la plasticité synaptique dans lesquels sont impliqués les NMDARs.

Il est possible que MND et les NMDARs forment un complexe au niveau de la membrane et la dérégulation de l'un ou l'autre pourrait déstabiliser ce complexe. Ainsi, il est possible que ces deux protéines interagissent de manière directe ou indirecte. Il serait possible de détecter cette potentielle interaction par Co-immunoprécipitation (CoIP). De plus, des analyses de la localisation des NMDARs en condition de dérégulation de *mnd* pourrait indiquer si l'absence de MND impacte la localisation des NMDARs à la membrane. Ces expériences ont été entreprises au cours de ma thèse mais n'ont, à ce jour, pas permis d'éclaircir ces questions. Il serait intéressant de continuer ces investigations.

Par intersection d'expression génétique, nous avons mis en évidence l'expression conjointe de la région régulatrice *mnd*²⁴⁻¹ de *mnd* et de cinq récepteurs au glutamate (*NmdaR1*, *NmdaR2*, *KaiR1D*, *GluCl α* , et *mGluR*) dans les neurones faisant partie des KC α/β , et de deux récepteurs (*KaiR1D* et *mGluR*) dans les KC γ . Comme discuté en partie 1, l'expression de *mnd*²⁴⁻¹ au sein des KC α/β core n'est pas clairement définie et il est possible que MND soit présente dans ces neurones. D'après nos analyses des profils d'expression des RGlus, particulièrement les sections de pédoncules, nous montrons une expression de *NmdaR2* et *GluCl α* dans les KC α/β core (Fig.R35 ; Fig.R47). Il serait intéressant de déterminer si le fonctionnement des KC α/β core vis-à-vis du glutamate est similaire à celui des KC α/β *mnd*²⁴⁻¹positives. Des expériences complémentaires sur ce groupe de KCs grâce à un driver spécifique MB594B (Shih *et al.*, 2018) devraient infirmer ou confirmer le rôle de MND sur la

réponse au glutamate de ces neurones spécifiques. Cela pourra donner des indices quant à la potentielle fonction de MND dans ce groupe de neurones qui semblent être nécessaires au rappel de la mémoire appétitive (Perisse *et al.*, 2013).

Pour confirmer les résultats d'imagerie calcique montrant l'implication de MND dans la réponse au NMDA des CPs, un sauvetage du phénotype devrait être réalisé par la surexpression de *mnd* dans les cerveaux *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-mnd^{dsRNAkk} ;UAS-mnd*. Cette réponse devrait être similaire à celle obtenue avec les cerveaux témoins *mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s*. Cependant, il est possible que sur-exprimer *mnd* ne suffise pas à sauver le phénotype car *mnd* code la chaîne légère d'un HAT, qui n'est qu'une sous-unité du complexe protéique du transporteur. Il faudrait sur-exprimer la chaîne lourde en même temps pour permettre l'ancrage du HAT à la membrane afin d'obtenir un complexe fonctionnel (*mnd²⁴⁻¹-Gal4>UAS-GCaMP6s ;UAS-mnd^{dsRNAkk} ;UAS-mnd ;UAS-CD98hc*). Cependant, il est à redouter une titration du GAL4 avec les 4 séquences UAS présentes dans le génotype. C'est pourquoi il faudra utiliser les deux systèmes d'induction *Gal4/UAS* et *LexA/LexAop*.

Une des limitations de cette étude est qu'il est difficile d'avoir des antagonistes ou agonistes spécifiques de chaque type des récepteurs au glutamate. De plus, la classification des iGluRs a été élaboré à partir des propriétés des iGluRs de mammifères et leur spécificité de substrat. Or, chez la drosophile, même s'il existe de fortes homologues de séquences, les fonctions biologiques ne sont pas forcément totalement similaires. En effet, Li et collaborateurs (2016) démontrent que, chez la drosophile, le NMDA active bien les récepteurs NMDA, comme chez les mammifères, mais inhibe également le récepteur de type Kainate formé avec la sous-unité KaiR1D, en maintenant une conformation du canal ouvert. Ainsi, lors de nos expériences d'imagerie calcique avec le NMDA, il est possible que simultanément nous activions les NMDARs et inhibions les KaiR1D exprimés dans les CPs (Kondo *et al.*, 2020 ; Fig.R41, Fig.R42). Cependant, nous avons testé différentes concentrations de NMDA pour déterminer laquelle permettait d'activer les neurones des CPs (Fig.R51). Ce qui pourrait signifier qu'à la concentration de 10 mM l'activation des récepteurs NMDA « prendrait le dessus » sur l'inhibition de KaiR1D. Il est intéressant de noter que lors de la dérégulation de *KaiR1D* dans les CPs la réponse au NMDA n'est pas statistiquement diminuée par rapport au témoin (Fig.R54). Cela suggère que KaiR1D

inhibée par le NMDA n'impacte pas la réponse calcique des CPs au NMDA de manière significative.

De manière étonnante, la dérégulation de *GluCl α* et de *mGluR* au sein des CPs abolit la réponse de ces neurones au glutamate (Fig.R50). *GluCl α* est connu pour avoir un rôle inhibiteur dans les lobes antennaires (Liu et Wilson, 2013). Il est possible que *mGluR* et *GluCl α* soient tous les deux impliqués dans une inhibition de la réponse calcique des CPs et donc les déréguler un par un ne lèverait pas cette inhibition. Cela pourrait expliquer pourquoi aucune activité calcique n'est observée en réponse au glutamate lors de leur dérégulation respective. Une dérégulation simultanée de ces deux récepteurs potentiellement inhibiteurs dans les CPs permettrait de déterminer si une double inhibition du signal glutamatergique est mise en jeu dans les neurones des CPs. Il serait intéressant de déterminer dans quel(s) compartiment(s) des lobes α/β sont exprimés les différents récepteurs au glutamate afin de mieux comprendre les régulations agonistes et antagonistes des compartiments des CPs entre eux.

Comme discuté en partie 1, MND est présent au sein des $KC\alpha'/\beta'$ des CPs (Fig.R11) et ces lobes sont associés au contrôle du réflexe de géotaxie négative (Riemensperger *et al.*, 2013). De plus, il semble qu'un contrôle glutamatergique intervienne via des MBONs glutamatergiques innervant les $KCs \alpha'/\beta'$ et $KCs \gamma$. En effet, l'activation de ces MBONs réduit ce réflexe (Sun *et al.*, 2018). Nous avons montré que déréguler *mnd* abolissait la capacité des $KC\alpha/\beta$ et γ à répondre au glutamate, en partie via NMDAR1 (Fig.R55). Il serait donc intéressant d'étudier la dérégulation de *mnd* spécifiquement dans les $KC\alpha'/\beta'$ afin de savoir s'ils réagissent comme les autres KCs vis-à-vis du NMDA et pourrait donc participer au contrôle de l'activité locomotrice, ou d'autres comportements régulés par ces KCs comme la formation et la consolidation de la mémoire appétitive (Krashes *et al.*, 2007).

Le fait de déréguler NMDAR1 dans les CPs ne module pas le comportement d'agressivité semble étonnant. Différents indices laissent supposer que ces récepteurs jouent un rôle dans le contrôle de ce comportement. Ces récepteurs sont retrouvés dans les CPs (Sinakevitch *et al.*, 2010 ; Kondo *et al.*, 2020), structures impliquées dans l'agressivité (Baier *et al.*, 2002 ; Edwards *et al.*, 2009 ; Chouhan *et al.*, 2017) et dans la mémoire et l'apprentissage (Krashes et Waddell, 2008), processus cognitifs

indispensables à certains aspects de l'agressivité (Trannoy *et al.*, 2017). De plus, une hyper agressivité semble liée à la dérégulation de *NmdaR1* (Zwarts *et al.*, 2011). Chez les rongeurs, ces récepteurs NMDA sont présents dans les régions neuronales liées au contrôle émotionnel comme le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe (Chang *et al.*, 2018). De plus, ils sont impliqués dans la régulation des comportements sociaux (Zoicas et Kornhuber, 2019). Inhiber spécifiquement ces récepteurs NMDA par des agents pharmacologiques induit une diminution des comportements d'agressifs et à l'inverse activer ces récepteurs les augmentent (Chang *et al.*, 2018). Toutes ces études mettent en évidence l'importance d'une voie glutamatergique impliquant les NMDARs dans le contrôle de l'agressivité. Décrit comme unité catalytique, NMDAR1 doit s'associer à NMDAR2 pour être fonctionnel chez les mammifères (Traynelis *et al.*, 2010). De plus, nous montrons en imagerie calcique que la dérégulation de l'une ou l'autre des sous-unités des NMDARs (*NmdaR1* ou *NmdaR2*) présentent les mêmes effets sur l'activation des CPs (Fig.R52). Chaque sous-unité semble essentielle pour former un récepteur fonctionnel et il ne semble pas y avoir d'effet de redondance entre ces deux sous-unités. Ainsi, le manque de phénotype comportemental lors de la dérégulation de *NmdaR1* dans les CPs ne semble pas pouvoir s'expliquer par une redondance fonctionnelle avec NMDAR2.

D'autre part, il semble qu'une voie NMDAR dépendante de MND spécifiquement chez les mâles est modulée par l'exposition chronique au cVA, mimant la vie en groupe. De manière intéressante, nous avons montré en première partie de résultats, comme Liu et collaborateurs (2011) également, que le fait d'élever des individus en groupe diminue leur comportement agressif. Et comme les CPs régulent l'agressivité en intégrant un grand nombre de signaux environnementaux, il est intéressant de rapprocher cette régulation environnementale de l'agressivité avec la modulation de l'activité des CPs en fonction des interactions mâle-mâle impliquant le cVA. Il est possible que la détection de signaux glutamatergique via les récepteurs NMDARs dépendante de MND puisse avoir un rôle dans la modulation de l'agressivité par le biais du cVA. Il serait intéressant de voir si la voie NMDARs/MND est impliquée dans l'inhibition de l'agressivité en passant par l'activation des neurones olfactifs sensoriels exprimant OR65a, impliqués dans la détection du cVA de manière chronique (Liu *et al.*, 2011). L'inhibition de ces neurones spécifiques chez les mâles groupés devrait induire une augmentation de l'activité des CPs en réponse au NMDA, similaire à celle des mâles isolés.

Il semble qu'une voie de détection du glutamate impliquant mGluR par les $KC\alpha/\beta$ et γ des CPs ait un rôle dans la modulation des stratégies d'agressivité chez les individus isolés. mGluR inhibe l'agressivité physique (luntes) mais ne semble pas moduler l'agressivité visuelle (threats) (Fig.R65, Fig.R66). Les mGLUR chez les mammifères sont aussi impliqués dans le contrôle de l'agressivité (Masugi-Tokita *et al.*, 2016). En effet des souris KO pour le *mgluR* de type 7 montre une agressivité mâle-mâle réduite. Une régulation du comportement d'agressivité, qui semble conservé entre la drosophile et les mammifères, implique des mécanismes de contrôle de neurones via les récepteurs métabotropiques au glutamate.

Il a été montré que trois types de MBONs : MBON- $\alpha 3$; MBON- $\gamma 3, \gamma 3' \beta 1$ et MBON- $\beta 2mp$ ont un rôle important dans la formation et le retour de la LTM, mais pas dans la ARM. De plus, la LTM nécessite une synthèse de protéines de manière séquentielles dans ces MBONs (Wu *et al.*, 2017). Ainsi, le glutamate sécrété par le MBON $\beta 2mp$ (Aso *et al.*, 2014 ; Li et al 2020) semble être un neurotransmetteur important pour la formation de la mémoire. Ces mécanismes mnésiques pourraient potentiellement être impliquée dans l'adaptabilité de la stratégie de combat en passant par les mGluRs présents dans les $KC\alpha/\beta$ et γ . De plus, MND de par sa fonction de transporteur d'AAs pourrait jouer un rôle dans l'entrée de AAs pour la synthèse protéique nécessaire à la formation de la LTM. Il serait alors intéressant d'étudier la formation de la LTM en dérégulant *mnd* dans les CPs ainsi que les aspects de l'agressivité impliquant la mémoire comme le « loser effect ».

Discussion générale
&
Perspectives

Conclusions générales et perspectives

La question centrale de ma thèse a été d'essayer de mieux comprendre les fonctions de MND au sein des neurones du SNC et particulièrement les neurones des CPs. La figure P1 regroupe les principales perspectives.

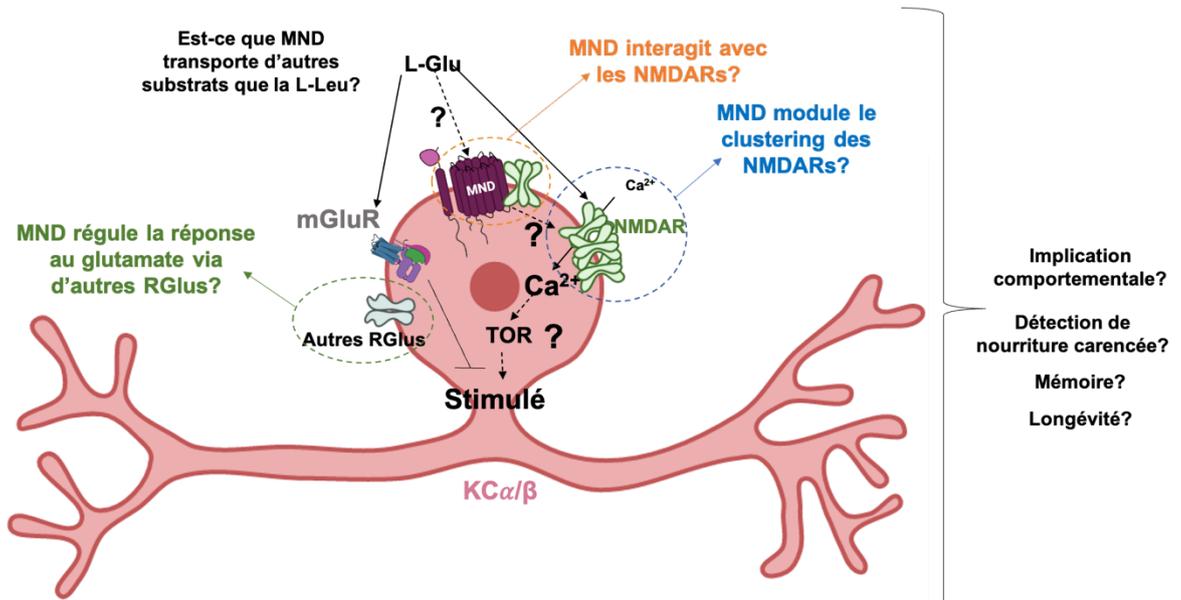


Fig. P1 : MND, NMDARs et mGluR, acteurs des corps pédonculés.

Mes résultats suggèrent que MND présent dans les KCa/β des CPs transporte la leucine, permettant une activation calcique des neurones, en impliquant une voie TOR. La leucine est un EAA apporté uniquement par l'alimentation, aucune voie d'endosynthèse n'ayant été identifiée. D'après Reynold *et al.*, 2009, la leucine peut être transportée par MND. Chez la larve, MND présent dans les IPCs permet la libération de DILPs en présence de leucine (Manière *et al.*, 2016). De plus, d'autres neurones peuvent détecter des AAs, notamment des neurones dopaminergiques, via un SLC7A, un CAT appelé Slimfast, (Bjordal *et al.*, 2015). Chez l'adulte, CG13248, codant un potentiel SLC7A4 (Ceder et Fredriksson, 2022), est présent dans 6 neurones exprimant la Diuretic Hormone 44 (DH44) localisés au niveau de la PI et permettent la détection d'AAs, notamment le glutamate (Yang *et al.*, 2018). Nous mettons ici en lumière une autre structure du SNC, les neurones α/β des CPs, capable de détecter directement différents L-AAAs : L-Arg, L-Asp, L-Lys, L-Leu, L-Ile, L-Glu, L-Thr, grâce à un autre transporteur SLC7A, du type LAT, MND. Il est possible que cette spécificité d'expression de SLC7A soit étroitement corrélée à la demande métabolique de chaque

cellule. Ce qui expliquerait pourquoi certains transporteurs de AAs sont plutôt ubiquitaires et d'autres plus spécifiques.

La détection centrale des acides aminés chez la larve (Bjordal *et al.*, 2015) et chez l'adulte (Yang *et al.*, 2018) régule les comportements alimentaires. En effet chez la larve, un régime alimentaire carencé en EAAs est détecté et initie une recherche de nourriture plus riche en EAAs (Bjordal *et al.*, 2015). Chez l'adulte, la consommation de nourriture est dépendante d'un transporteur putatif d'acides aminés, CG13248 dans les neurones DH44+ (Yang *et al.*, 2018). Il serait intéressant de rechercher si MND peut jouer un rôle au sein des CPs dans la régulation de la prise alimentaire, mais également dans les mécanismes de mémoire en fonction du régime alimentaire. Les drosophiles sont-elles plus performantes à jeun ou nourries avec différents régimes alimentaires pauvres ou enrichis en leucine ? Cela permettrait de déterminer si MND peut jouer un rôle dans la mémoire en fonction du statut nutritionnel. De plus, les CPs ont été montrés comme centre de contrôle de la satiété (Tsao *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant de regarder la localisation de la protéine MND dans les CPs entre des individus nourris ou à jeun et évaluer si celle-ci est différente. De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle de MND au sein des CPs dans les comportements alimentaires, en faisant par exemple des tests de recherche de nourriture ou de détection de nourriture carencée (Fig.P1).

La restriction alimentaire en EAAs, comme la leucine, peut avoir une incidence sur la durée de vie. Elle est décrite pour prolonger la durée de vie en impliquant la voie de signalisation TOR (Emran *et al.*, 2014 ; Kapahi *et al.*, 2004). Il a été montré que les KCa/β sont impliqués dans l'allongement de la durée de vie en impliquant une voie TOR (Lien *et al.*, 2020). Nous avons montré que MND est impliqué dans la réponse des CPs aux EAAs, via la voie TOR au sein des CPs. MND pourrait potentiellement jouer un rôle dans ce processus d'allongement de durée vie des individus. Des analyses de longévité des individus dont *mnd* est dérégulé dans les CPs pourraient donner des indices quant à l'implication de MND dans ce processus (Fig.P1).

Chez les mammifères, l'hypothalamus joue un rôle primordial dans la régulation de la prise alimentaire (Ahima et Antwi, 2008). Les neurones hypothalamiques du noyau ventromédian et du noyau arqué qui expriment les récepteurs à la leptine, hormone anorexigène, joue un rôle dans l'homéostasie énergétique (Ahima et Antwi, 2008). Ces neurones expriment également LAT1

(SLC7A5) (Park *et al.*, 2023) potentiel orthologue de MND. De manière intéressante, la sensibilité à la leptine de ces neurones est modulée par les BCAAs comme la leucine via LAT1 et la voie TOR (Park *et al.*, 2023). Les souris KO pour le gène *slc7a5* dans ces neurones développent un phénotype proche de l'obésité. Il serait intéressant de déterminer si MND joue un rôle similaire dans les neurones gouvernant la prise alimentaire chez la drosophile comme les neurones NPF (NPY like neurones) et les neurones MIP (POMC like neurones). Des travaux préliminaires dans l'équipe montrent la présence de MND et JHI-21 dans ces deux types de neurones dans le cerveau larvaire.

Les comportements agressifs ont un coût énergétique et métabolique que l'organisme doit prendre en compte. Il a été montré qu'une voie impliquant les IPCs et les *Dilps* régule le comportement d'agressivité (Luo *et al.*, 2014). Les KCs expriment l'unique récepteur aux DILPs *InR* (Crocker *et al.*, 2018 ; Zhao et Campos, 2012) qui est impliqué dans les mécanismes mnésiques chez la larve (Eschment *et al.*, 2020). Les KCs sont donc régulées par une voie insuline. LAT1 module la sensibilité à la leptine de neurones hypothalamiques en régulant l'activité des récepteurs à la leptine (Park *et al.*, 2023). Un LAT1-like, MND régule l'activité des récepteurs NMDA au glutamate au niveau des CPs, il est possible qu'il puisse également moduler l'activité d'autres récepteurs comme celui des DILPs par exemple. Ainsi MND pourrait jouer un rôle dans la sensibilité des CPs aux DILPs et donc moduler les capacités mnésiques.

Le comportement d'agressivité est étroitement régulé par la détection de molécules chimio-sensorielles (phéromones et odeurs de nourriture) (Hoopfer, 2016). Miyashita et collaborateurs (2023) montrent que les cellules gliales libèrent du glutamate qui se fixe sur les NMDARs des KCs pour moduler l'apprentissage olfactif aversif. Nos résultats montrent que MND est nécessaire à la réponse au glutamate des KCs par les NMDARs. Il est possible que MND soit impliqué dans le processus de consolidation de la mémoire nécessaire à l'apprentissage olfactif associatif (Fig.P2).

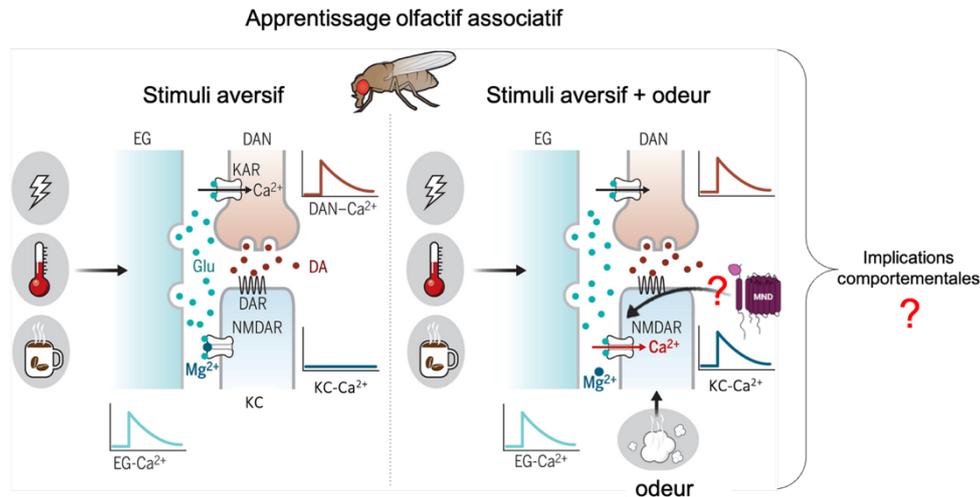


Fig. P2 : Implication hypothétique de MND dans l'apprentissage olfactif associatif au sein des KCs en régulant le clustering des NMDARs

Potentielle implication de MND au sein des CPs dans l'apprentissage olfactif associatif, et les comportements associés. EG : Ensheathing Glia, DAN : neurones dopaminergiques ; KAR : récepteur Kainate ; DA : dopamine ; DAR : récepteur à la dopamine ; NMDAR : récepteur NMDA. Schéma modifié d'après Miyashita *et al.*, 2023

Il serait aussi intéressant d'étudier la fonction de MND dans les IPCs chez l'adulte d'un point de vue comportementale. En effet, Manière et collaborateurs (2016) ont démontré que MND est impliqué dans la régulation de sécrétion de DILPs en réponse à la leucine présente dans l'hémolymphe. Les IPCs ont été identifiées comme exprimant le récepteur à l'Octopamine OAMB et à la sérotonine 5HT1A (Luo *et al.*, 2014), deux neuropeptides impliqués dans l'agressivité (Dierick et Greenspan, 2007 ; Alekseyenko *et al.*, 2014). Le signal octopaminergique reçu par ces IPCs via OAMB diminue l'expression de *Dilp3*, et est indispensable au comportement d'agressivité (attaques physiques et visuelles). Le signal sérotoninergique arrivant aux IPCs via le 5HT1A diminue l'expression de *Dilp2* et *Dilp5*, et diminue les menaces visuelles mais stimule les attaques physiques (Luo *et al.*, 2014). Ainsi, il y aurait un lien entre l'expression de *Dilp*, la sérotonine et l'octopamine au niveau des IPCs (Luo *et al.*, 2014, Nässel *et al.*, 2013) pour la modulation de l'agressivité (Luo *et al.*, 2014). Il serait intéressant de voir l'effet de la dérégulation de *mnd* au sein des IPCs, qui devrait déréguler la sécrétion de DILPs (Manière *et al.*, 2016) dans le comportement d'agressivité. Cela permettrait de renforcer l'idée que l'agressivité est en partie régulée par la voie insuline et le métabolisme interne.

Chez les mammifères, la leucine peut activer la voie TOR au sein de différents types cellulaires (Liu et Sabatini, 2020). Nous montrons également que l'activation des KCa/β des CPs par la leucine via MND implique une voie TOR chez la drosophile.

Ces résultats semblent être similaires à ceux également trouvés dans les cellules gliales où la leucine active une voie TOR via la protéine sestrine chez la drosophile (Gu *et al.*, 2022). Dans les cellules gliales, une augmentation de la leucine va empêcher les sestrines d'inhiber TOR. Ainsi activé, la voie TOR induit une modulation des comportements de recherche de nourriture en privilégiant les choix de nourriture contenant de la leucine ainsi que le choix du lieu de ponte. Nous avons montré que MND était présent au sein de cellules gliales, également observé par Park et collaborateurs (2022) et Li et collaborateurs (2023). Il serait intéressant d'étudier l'implication des SLC7A tels que MND dans le contrôle du transport de leucine dans ce mécanisme au sein des cellules gliales.

Li et collaborateurs (2023) montrent une expression de *mnd* et *JhI-21* dans les cellules gliales formant la BHE. De plus, MND et JHI-21 sont présents au sein des IPCs et sont tous deux nécessaires à la sécrétion de DILPs en présence de leucine (Manière *et al.*, 2018, Ziegler *et al.*, 2018). Il est surprenant de voir que des cellules expriment communément deux transporteurs qui semblent avoir la même fonction de transport de la leucine (Reynolds *et al.*, 2009). Quelles sont leurs spécificités propres ? Ont-ils des localisations subcellulaires différentes ? Il serait intéressant de voir si JHI-21 est présent dans les CPs et joue le même rôle que MND vis-à-vis des L-AAs, ou non.

Ainsi la meilleure compréhension des propriétés et des fonctions de MND chez la drosophile permettra de mieux comprendre les propriétés de LAT1 des mammifères. Une meilleure compréhension des maladies impliquant LAT1 facilitera le développement et l'amélioration des traitements et thérapies ciblées sur ce transporteur. De plus, l'implication d'un transporteur d'acides aminés du système L dans le fonctionnement neuronal ouvre de nouvelles questions quant à leurs potentiels rôles dans la régulation de l'activité du SNC, notamment glutamatergique, et la mise de place de comportements complexes.

Références bibliographiques

- Aboudhiah, S.; Alves, G.; Parrot, S.; Amri, M.; Simonnet, M. M.; Grosjean, Y.; Manière, G.; Seugnet, L. LAT1-like Transporters Regulate Dopaminergic Transmission and Sleep in *Drosophila*. *Sleep* **2018**, *41* (10).
- Adams, M. D. The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*. *Science* **2000**, *287* (5461), 2185–2195.
- Agrawal, P.; Kao, D.; Chung, P.; Looger, L. L. The Neuropeptide Drosulfakinin Regulates Social Isolation-Induced Aggression in *Drosophila*. *J Exp Biol* **2020**, *223* (2), jeb207407.
- Ahima, R. S.; Antwi, D. A. Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2008**, *37* (4), 811–823.
- Alekseyenko, O. V.; Chan, Y.-B.; Fernandez, M. de la P.; Bülow, T.; Pankratz, M. J.; Kravitz, E. A. Single Serotonergic Neurons That Modulate Aggression in *Drosophila*. *Current Biology* **2014**, *24* (22), 2700–2707.
- Alekseyenko OV, Chan YB, Li R, Kravitz EA. Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**, *110*(15):6151-6.
- Amidfar, M.; Woelfer, M.; Réus, G. Z.; Quevedo, J.; Walter, M.; Kim, Y.-K. The Role of NMDA Receptor in Neurobiology and Treatment of Major Depressive Disorder: Evidence from Translational Research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2019**, *94*, 109668.
- Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. **2012**, *15*(4):239-46.
- Andersen, J. V.; Markussen, K. H.; Jakobsen, E.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S.; Rosenberg, P. A.; Aldana, B. I. Glutamate Metabolism and Recycling at the Excitatory Synapse in Health and Neurodegeneration. *Neuropharmacology* **2021**, *196*, 108719.
- Aso, Y.; Grübel, K.; Busch, S.; Friedrich, A. B.; Siwanowicz, I.; Tanimoto, H. The Mushroom Body of Adult *Drosophila* Characterized by GAL4 Drivers. *Journal of Neurogenetics* **2009**, *23* (1–2), 156–172.
- Aso, Y.; Hattori, D.; Yu, Y.; Johnston, R. M.; Iyer, N. A.; Ngo, T.-T.; Dionne, H.; Abbott, L.; Axel, R.; Tanimoto, H.; Rubin, G. M. The Neuronal Architecture of the Mushroom Body Provides a Logic for Associative Learning. *eLife* **2014**, *3*, e04577.
- Aso, Y.; Siwanowicz, I.; Bräcker, L.; Ito, K.; Kitamoto, T.; Tanimoto, H. Specific Dopaminergic Neurons for the Formation of Labile Aversive Memory. *Curr Biol* **2010**, *20* (16), 1445–1451.
- Augustin, H.; Grosjean, Y.; Chen, K.; Sheng, Q.; Featherstone, D. E. Nonvesicular Release of Glutamate by Glial XCT Transporters Suppresses Glutamate Receptor Clustering In Vivo. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27* (1), 111–123.
- Ayka, A.; Şehirli, A. Ö. The Role of the SLC Transporters Protein in the Neurodegenerative Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* **2020**, *18* (2), 174–187.
- Bagchi S, Baomar HA, Al-Walai S, Al-Sadi S, Fredriksson R. Histological analysis of SLC38A6 (SNAT6) expression in mouse brain shows selective expression in excitatory neurons with high expression in the synapses. *PLoS One*. **2014**, *9*(4):e95438.
- Baier, A.; Wittek, B.; Brembs, B. *Drosophila* as a New Model Organism for the Neurobiology of Aggression? *J Exp Biol* **2002**, *205* (Pt 9), 1233–1240.
- Bailly, T. P. M.; Kohlmeier, P.; Etienne, R. S.; Wertheim, B.; Billeter, J.-C. Social Modulation of Oogenesis and Egg Laying in *Drosophila Melanogaster*. *Curr Biol* **2023**, *33* (14), 2865-2877.e4.
- Balthasar, N.; Coppari, R.; McMinn, J.; Liu, S. M.; Lee, C. E.; Tang, V.; Kenny, C. D.; McGovern, R. A.; Chua, S. C.; Elmquist, J. K.; Lowell, B. B. Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis. *Neuron* **2004**, *42* (6), 983–991.

- Barnstedt, O.; Oswald, D.; Felsenberg, J.; Brain, R.; Moszynski, J.-P.; Talbot, C. B.; Perrat, P. N.; Waddell, S. Memory-Relevant Mushroom Body Output Synapses Are Cholinergic. *Neuron* **2016**, *89* (6), 1237–1247.
- Baronas, V. A.; Yang, R. Y.; Morales, L. C.; Sipione, S.; Kurata, H. T. Slc7a5 Regulates Kv1.2 Channels and Modifies Functional Outcomes of Epilepsy-Linked Channel Mutations. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 4417.
- Bergeron MJ, Simonin A, Bürzle M, Hediger MA. Inherited epithelial transporter disorders—an overview. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. **2008**, *31*(2):178-87.
- Bjordan, M.; Arquier, N.; Kniazeff, J.; Pin, J. P.; Léopold, P. Sensing of Amino Acids in a Dopaminergic Circuitry Promotes Rejection of an Incomplete Diet in *Drosophila*. *Cell* **2014**, *156* (3), 510–521.
- Bogdanik, L. The *Drosophila* Metabotropic Glutamate Receptor DmGluRA Regulates Activity-Dependent Synaptic Facilitation and Fine Synaptic Morphology. *Journal of Neuroscience* **2004**, *24* (41), 9105–9116.
- Boto T, Stahl A, Zhang X, Louis T, Tomchik SM. Independent Contributions of Discrete Dopaminergic Circuits to Cellular Plasticity, Memory Strength, and Valence in *Drosophila*. *Cell Reports*. **2019**, *27*(7):2014-2021.e2.
- Brand, A. H.; Perrimon, N. Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* **1993**, *118* (2), 401–415.
- Braga MFM, Aroniadou-Anderjaska V, Li H. The physiological role of kainate receptors in the amygdala. *Mol Neurobiol*. **2004**, *30*(2):127-41.
- Brünner, B.; Saumweber, J.; Samur, M.; Weber, D.; Schumann, I.; Mahishi, D.; Rohwedder, A.; Thum, A. S. Food Restriction Reconfigures Naïve and Learned Choice Behavior in *Drosophila* Larvae. *Journal of Neurogenetics* **2020**, *34* (1), 123–132.
- Cano-Crespo, S.; Chillarón, J.; Junza, A.; Fernández-Miranda, G.; García, J.; Polte, C.; R. de la Ballina, L.; Ignatova, Z.; Yanes, Ó.; Zorzano, A.; Stephan-Otto Attolini, C.; Palacín, M. CD98hc (SLC3A2) Sustains Amino Acid and Nucleotide Availability for Cell Cycle Progression. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 14065.
- Cappoli, N., Jenkinson, M. D., Dello Russo, C. & Dickens, D. LAT1, a novel pharmacological target for the treatment of glioblastoma. *Biochem Pharmacol* **2022**, *201*, 115103.
- Caron, S. J. C.; Ruta, V.; Abbott, L. F.; Axel, R. Random Convergence of Olfactory Inputs in the *Drosophila* Mushroom Body. *Nature* **2013**, *497* (7447), 113–117.
- Ceder, M. M.; Fredriksson, R. A Phylogenetic Analysis between Humans and *D. Melanogaster*: A Repertoire of Solute Carriers in Humans and Flies. *Gene* **2022**, *809*,
- Certel, S. J.; Kravitz, E. A. Scoring and Analyzing Aggression in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, *2012* (3), 319–325.
- Certel SJ, Leung A, Lin CY, Perez P, Chiang AS, Kravitz EA. Octopamine neuromodulatory effects on a social behavior decision-making network in *Drosophila* males. *PLoS One*. **2010**, *5*(10):e13248.
- Chang, C.-H.; Su, C.-L.; Gean, P.-W. Mechanism Underlying NMDA Blockade-Induced Inhibition of Aggression in Post-Weaning Socially Isolated Mice. *Neuropharmacology* **2018**, *143*, 95–105.
- Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R. & Kravitz, E. A. Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 5664–5668.
- Chen, T.-W.; Wardill, T. J.; Sun, Y.; Pulver, S. R.; Renninger, S. L.; Baohan, A.; Schreiter, E. R.; Kerr, R. A.; Orger, M. B.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Svoboda, K.; Kim, D. S. Ultra-Sensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity. *Nature* **2013**, *499* (7458), 295–300.
- Chohan MO, Iqbal K. From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **2006**;10(1):81-7.

- Chouhan, N. S.; Mohan, K.; Ghose, A. CAMP Signaling Mediates Behavioral Flexibility and Consolidation of Social Status in *Drosophila* Aggression. *J Exp Biol* **2017**, *220* (Pt 23), 4502–4514.
- Closs, E. I.; Boissel, J.-P.; Habermeier, A.; Rotmann, A. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J Membrane Biol* **2006**, *213* (2), 67–77.
- Chowdhury B, Chan YB, Kravitz EA. Putative transmembrane transporter modulates higher-level aggression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2017**, *114*(9):2373-8.
- Chowdhury B, Wang M, Gnerer JP, Dierick HA. The Divider Assay is a high-throughput pipeline for aggression analysis in *Drosophila*. *Commun Biol*. **2021**, 4:85.
- Clowney, E. J.; Iguchi, S.; Bussell, J. J.; Scheer, E.; Ruta, V. Multimodal Chemosensory Circuits Controlling Male Courtship in *Drosophila*. *Neuron* **2015**, *87* (5), 1036–1049.
- Colombani, J.; Raisin, S.; Pantalacci, S.; Radimerski, T.; Montagne, J.; Léopold, P. A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* **2003**, *114* (6), 739–749.
- Conrad, M. & Sato, H. The oxidative stress-inducible cystine / glutamate antiporter, system x (c) (-): cystine supplier and beyond. *Amino Acids* **2012**, *42*, 231–246.
- Cota, D.; Proulx, K.; Smith, K. A. B.; Kozma, S. C.; Thomas, G.; Woods, S. C.; Seeley, R. J. Hypothalamic MTOR Signaling Regulates Food Intake. *Science* **2006**, *312* (5775), 927–930.
- Crocker, A.; Guan, X.-J.; Murphy, C. T.; Murthy, M. Cell-Type-Specific Transcriptome Analysis in the *Drosophila* Mushroom Body Reveals Memory-Related Changes in Gene Expression. *Cell Rep* **2016**, *15* (7), 1580–1596.
- Cully, D. F.; Paresse, P. S.; Liu, K. K.; Schaeffer, J. M.; Arena, J. P. Identification of a *Drosophila Melanogaster* Glutamate-Gated Chloride Channel Sensitive to the Antiparasitic Agent Avermectin. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (33), 20187–20191.
- Dankert, H.; Wang, L.; Hoopfer, E. D.; Anderson, D. J.; Perona, P. Automated Monitoring and Analysis of Social Behavior in *Drosophila*. *Nat Methods* **2009**, *6* (4), 297–303.
- Davie, K.; Janssens, J.; Koldere, D.; De Waegeneer, M.; *et al.* A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Aging *Drosophila* Brain. *Cell* **2018**, *174* (4), 982-998.e20.
- Deng, B.; Li, Q.; Liu, X.; Cao, Y.; Li, B.; Qian, Y.; Xu, R.; Mao, R.; Zhou, E.; Zhang, W.; Huang, J.; Rao, Y. Chemoconnectomics: Mapping Chemical Transmission in *Drosophila*. *Neuron* **2019**, *101* (5), 876-893.e4.
- Devaud JM, Clouet-Redt C, Bockaert J, Grau Y, Parmentier ML. Widespread brain distribution of the *Drosophila* metabotropic glutamate receptor. *NeuroReport*. **2008**, *19*(3):367.
- Diagana TT, Thomas U, Prokopenko SN, Xiao B, Worley PF, Thomas JB. Mutation of *Drosophila* homer Disrupts Control of Locomotor Activity and Behavioral Plasticity. *J Neurosci*. **2002**, *22*(2):428-36.
- Dierick, H. A.; Greenspan, R. J. Serotonin and Neuropeptide F Have Opposite Modulatory Effects on Fly Aggression. *Nat Genet* **2007**, *39* (5), 678–682.
- Dubrovsky, E. B.; Dubrovskaya, V. A.; Berger, E. M. Juvenile Hormone Signaling during Oogenesis in *Drosophila Melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *32* (11), 1555–1565.
- Edwards, A. C.; Zwarts, L.; Yamamoto, A.; Callaerts, P.; Mackay, T. F. Mutations in Many Genes Affect Aggressive Behavior in *Drosophila Melanogaster*. *BMC Biol* **2009**, *7*, 29.
- Edwards, T. N.; Meinertzhagen, I. A. The Functional Organisation of Glia in the Adult Brain of *Drosophila* and Other Insects. *Prog Neurobiol* **2010**, *90* (4), 471–497.
- Ellis, K. E.; Bervoets, S.; Smihula, H.; Ganguly, I.; Vigato, E.; Auer, T. O.; Benton, R.; Litwin-Kumar, A.; Caron, S. J. C. Evolution of Connectivity Architecture in the *Drosophila* Mushroom Body. *bioRxiv* **2023**, p 2023.02.10.528036.

- Emran, S.; Yang, M.; He, X.; Zandveld, J.; Piper, M. D. W. Target of Rapamycin Signalling Mediates the Lifespan-Extending Effects of Dietary Restriction by Essential Amino Acid Alteration. *Aging* **2014**, *6* (5), 390–398.
- Eschment, M.; Franz, H. R.; Güllü, N.; Hölscher, L. G.; Huh, K.-E.; Widmann, A. Insulin Signaling Represents a Gating Mechanism between Different Memory Phases in *Drosophila* Larvae. *PLOS Genetics* **2020**, *16* (10), e1009064.
- Featherstone, D. E. Glial Solute Carrier Transporters in *Drosophila* and Mice. *Glia* **2011**, *59* (9), 1351–1363.
- Featherstone DE. An Essential *Drosophila* Glutamate Receptor Subunit That Functions in Both Central Neuropil and Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience*. **2005**, *25*(12):3199-208.
- Felsenberg, J.; Barnstedt, O.; Cognigni, P.; Lin, S.; Waddell, S. Re-Evaluation of Learned Information in *Drosophila*. *Nature* **2017**, *544* (7649), 240–244.
- Feral, C. C.; Nishiya, N.; Fenczik, C. A.; Stuhlmann, H.; Slepak, M.; Ginsberg, M. H. CD98hc (SLC3A2) Mediates Integrin Signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (2), 355–360.
- Fernstrom, J. D. Dietary Amino Acids and Brain Function. *J Am Diet Assoc* **1994**, *94* (1), 71–77.
- Fernstrom, J. D.; Fernstrom, M. H. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J Nutr* **2007**, *137* (6 Suppl 1), 1539S-1547S; discussion 1548S.
- Fotiadis, D.; Kanai, Y.; Palacín, M. The SLC3 and SLC7 Families of Amino Acid Transporters. *Mol Aspects Med* **2013**, *34* (2–3), 139–158.
- Franchini, L.; Stanic, J.; Ponzoni, L.; Mellone, M.; Carrano, N.; Musardo, S.; Zianni, E.; Olivero, G.; Marcello, E.; Pittaluga, A.; Sala, M.; Bellone, C.; Racca, C.; Di Luca, M.; Gardoni, F. Linking NMDA Receptor Synaptic Retention to Synaptic Plasticity and Cognition. *iScience* **2019**, *19*, 927–939.
- Frank DD, Jouandet GC, Kearney PJ, Macpherson LJ, Gallio M. Temperature representation in the *Drosophila* brain. *Nature*. **2015**, *519*(7543):358-61.
- Frappalo, A.; Giansanti, M. G. Using *Drosophila Melanogaster* to Dissect the Roles of the MTOR Signaling Pathway in Cell Growth. *Cells* **2023**, *12* (22), 2622.
- Galagovsky, D.; Depetris-Chauvin, A.; Manière, G.; Geillon, F.; Berthelot-Grosjean, M.; Noirot, E.; Alves, G.; Grosjean, Y. Sobremesa L-Type Amino Acid Transporter Expressed in Glia Is Essential for Proper Timing of Development and Brain Growth. *Cell Reports* **2018**, *24* (12), 3156-3166.e4.
- Gauthier-Coles, G.; Vennitti, J.; Zhang, Z.; Comb, W. C.; Xing, S.; Javed, K.; Bröer, A.; Bröer, S. Quantitative Modelling of Amino Acid Transport and Homeostasis in Mammalian Cells. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 5282.
- Géminard, C.; Rulifson, E. J.; Léopold, P. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metab* **2009**, *10* (3), 199–207.
- Gielen, M. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate : Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. *Med Sci (Paris)* **2010**, *26* (1), 65–72.
- Gomez, J.; Mary, S.; Brabet, I.; Parmentier, M. L.; Restituto, S.; Bockaert, J.; Pin, J. P. Coupling of Metabotropic Glutamate Receptors 2 and 4 to G Alpha 15, G Alpha 16, and Chimeric G Alpha q/i Proteins: Characterization of New Antagonists. *Mol Pharmacol* **1996**, *50* (4), 923–930.
- Good, T. P.; Tatar, M. Age-Specific Mortality and Reproduction Respond to Adult Dietary Restriction in *Drosophila Melanogaster*. *J Insect Physiol* **2001**, *47* (12), 1467–1473.
- Grandison, R. C.; Piper, M. D. W.; Partridge, L. Amino Acid Imbalance Explains Extension of Lifespan by Dietary Restriction in *Drosophila*. *Nature* **2009**, *462* (7276), 1061–1064.
- Graveley, B. R.; Brooks, A. N.; Carlson, J. W et al. The Developmental Transcriptome of *Drosophila Melanogaster*. *Nature* **2011**, *471* (7339), 473–479.

- Grosjean, Y., Grillet, M., Augustin, H., Ferveur, J.-F. & Featherstone, D. E. A glial amino acid transporter controls synapse strength and courtship in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **2008**, 11, 54–61.
- Gu, X.; Jouandin, P.; Lalgudi, P. V.; Binari, R.; Valenstein, M. L.; Reid, M. A.; Allen, A. E.; Kamitaki, N.; Locasale, J. W.; Perrimon, N.; Sabatini, D. M. Sestrin Mediates Detection of and Adaptation to Low-Leucine Diets in *Drosophila*. *Nature* **2022**, 608 (7921), 209–216.
- Hägglund MGA, Hellsten SV, Bagchi S, Philippot G, Löfqvist E, Nilsson VCO, et al. Transport of L-glutamine, L-alanine, L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *J Mol Biol.* **2015**, 427(6 Pt B):1495-512.
- Hamasaka Y, Rieger D, Parmentier ML, Grau Y, Helfrich-Förster C, Nässel DR. Glutamate and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits. *Journal of Comparative Neurology.* **2007**, 505(1):32-45.
- Han TH, Dharkar P, Mayer ML, Serpe M. Functional reconstitution of *Drosophila melanogaster* NMJ glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2015**, 112(19):6182-7.
- Hancock, C. E.; Rostami, V.; Rachad, E. Y.; Deimel, S. H.; Nawrot, M. P.; Fiala, A. Visualization of Learning-Induced Synaptic Plasticity in Output Neurons of the *Drosophila* Mushroom Body γ -Lobe. *Sci Rep* **2022**, 12 (1), 10421.
- Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, Gibb AJ, et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol.* **2018**, 150(8):1081-105.
- Hediger, M. A.; Cl  men  on, B.; Burrier, R. E.; Bruford, E. A. The ABCs of Membrane Transporters in Health and Disease (SLC Series): Introduction. *Mol Aspects Med* **2013**, 34 (2–3), 95–107.
- Heeley, N.; Kirwan, P.; Darwish, T.; Arnaud, M.; Evans, M. L.; Merkle, F. T.; Reimann, F.; Gribble, F. M.; Blouet, C. Rapid Sensing of l -Leucine by Human and Murine Hypothalamic Neurons: Neurochemical and Mechanistic Insights. *Molecular Metabolism* **2018**, 10, 14–27.
- Heijenoort, J. van. Formation of the Glycan Chains in the Synthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Glycobiology* **2001**, 11 (3), 25R-36R.
- Heisenberg, M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* **2003**, 4, 266–275.
- Hoffmann, A. A. The Influence of Age and Experience with Conspecifics on Territorial Behavior In *Drosophila Melanogaster*. *J Insect Behav* **1990**, 3 (1), 1–12.
- H  glund PJ, Nordstr  m KJV, Schi  th HB, Fredriksson R. The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Mol Biol Evol.* **2011**, 28(4):1531-41.
- Hoopfer, E. D. Neural Control of Aggression in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* **2016**, 38, 109–118.
- Hoyer SC, Eckart A, Herrel A, Zars T, Fischer SA, Hardie SL, et al. Octopamine in Male Aggression of *Drosophila*. *Current Biology.* **2008**, 18(3):159-67.
- Huang C, Zheng X, Zhao H, Li M, Wang P, Xie Z, et al. A Permissive Role of Mushroom Body α/β Core Neurons in Long-Term Memory Consolidation in *Drosophila*. *Current Biology.* **2012**, 22(21):1981-9.
- Hunt, D. L.; Castillo, P. E. Synaptic Plasticity of NMDA Receptors: Mechanisms and Functional Implications. *Curr Opin Neurobiol* **2012**, 22 (3), 496–508.
- Isabel, G.; Pascual, A.; Preat, T. Exclusive Consolidated Memory Phases in *Drosophila*. *Science* **2004**, 304 (5673), 1024–1027.
- Ishii, K.; Cortese, M.; Leng, X.; Shokhirev, M. N.; Asahina, K. A Neurogenetic Mechanism of Experience-Dependent Suppression of Aggression. *Science Advances* **2022**, 8 (36), eabg3203.

- Ito, K.; Hotta, Y. Proliferation Pattern of Postembryonic Neuroblasts in the Brain of *Drosophila Melanogaster*. *Dev Biol* **1992**, *149* (1), 134–148.
- Jacob, A. L.; Weinberg, R. J. The Organization of AMPA Receptor Subunits at the Postsynaptic Membrane. *Hippocampus* **2015**, *25* (7), 798–812.
- Jacob, P. F.; Waddell, S. Spaced Training Forms Complementary Long-Term Memories of Opposite Valence in *Drosophila*. *Neuron* **2020**, *106* (6), 977-991.e4.
- Jefferis, G. S. X. E.; Marin, E. C.; Watts, R. J.; Luo, L. Development of Neuronal Connectivity in *Drosophila* Antennal Lobes and Mushroom Bodies. *Current Opinion in Neurobiology* **2002**, *12* (1), 80–86.
- Jeibmann, A.; Paulus, W. *Drosophila Melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases. *Int J Mol Sci* **2009**, *10* (2), 407–440.
- Jimenez, E. C. D-Amino Acid-Containing Peptides in Conus Venoms. **2017**, *10* (01).
- Jorgensen, R. Altered Gene Expression in Plants Due to Trans Interactions between Homologous Genes. *Trends Biotechnol* **1990**, *8* (12), 340–344.
- Kahsai, L.; Carlsson, M. A.; Winther, Å. M. E.; Nässel, D. R. Distribution of Metabotropic Receptors of Serotonin, Dopamine, GABA, Glutamate, and Short Neuropeptide F in the Central Complex of *Drosophila*. *Neuroscience* **2012**, *208*, 11–26.
- Kapahi, P.; Zid, B. M.; Harper, T.; Koslover, D.; Sapin, V.; Benzer, S. Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Current Biology* **2004a**, *14* (10), 885–890
- Ki, Y. & Lim, C. Sleep-promoting effects of threonine link amino acid metabolism in *Drosophila* neuron to GABAergic control of sleep drive. *eLife* **2019**, *8*, e40593.
- Kilgour, R. J.; Norris, D. R.; McAdam, A. G. Carry-over Effects of Resource Competition and Social Environment on Aggression. *Behavioral Ecology* **2020**, *31* (1), 140–151.
- Kim, T.; Song, B.; Lee, I.-S. *Drosophila* Glia: Models for Human Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (14), 4859.
- Kirkhart, C. & Scott, K. Gustatory Learning and Processing in the *Drosophila* Mushroom Bodies. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 5950–5958.
- Kobayashi, K.; Ohnishi, A.; Promsuk, J.; Shimizu, S.; Kanai, Y.; Shiokawa, Y.; Nagane, M. Enhanced Tumor Growth Elicited by L-Type Amino Acid Transporter 1 in Human Malignant Glioma Cells. *Neurosurgery* **2008**, *62* (2), 493–503; discussion 503-504.
- Kobe, B.; Kajava, A. V. The Leucine-Rich Repeat as a Protein Recognition Motif. *Curr Opin Struct Biol* **2001**, *11* (6), 725–732.
- Kockel, L.; Huq, L. M.; Ayyar, A.; Herold, *et al.* A *Drosophila* LexA Enhancer-Trap Resource for Developmental Biology and Neuroendocrine Research. *G3 (Bethesda)* **2016**, *6* (10), 3017–3026.
- Kondo, S.; Takahashi, T.; Yamagata, N.; Imanishi, Y.; Katow, H.; Hiramatsu, S.; Lynn, K.; Abe, A.; Kumaraswamy, A.; Tanimoto, H. Neurochemical Organization of the *Drosophila* Brain Visualized by Endogenously Tagged Neurotransmitter Receptors. *Cell Reports* **2020**, *30* (1), 284-297.e5.
- Krashes, M. J.; Keene, A. C.; Leung, B.; Armstrong, J. D.; Waddell, S. Sequential Use of Mushroom Body Neuron Subsets during *Drosophila* Odor Memory Processing. *Neuron* **2007**, *53* (1), 103–115.
- Krashes, M. J.; Waddell, S. Rapid Consolidation to a Radish and Protein Synthesis-Dependent Long-Term Memory after Single-Session Appetitive Olfactory Conditioning in *Drosophila*. *J Neurosci* **2008**, *28* (12), 3103–3113.
- Kravitz, E. A.; Fernandez, M. de la P. Aggression in *Drosophila*. *Behavioral Neuroscience* **2015**, *129* (5), 549–563.
- Kremer, M. C.; Jung, C.; Batelli, S.; Rubin, G. M.; Gaul, U. The Glia of the Adult *Drosophila* Nervous System. *Glia* **2017**, *65* (4), 606–638.
- Lange, A. B. Tyramine: From Octopamine Precursor to Neuroactive Chemical in Insects. *General and Comparative Endocrinology* **2009**, *162* (1), 18–26.

- Lee, J. H.; Budanov, A. V.; Park, E. J.; Birse, R.; Kim, T. E.; Perkins, G. A.; Ocorr, K.; Ellisman, M. H.; Bodmer, R.; Bier, E.; Karin, M. Sestrin as a Feedback Inhibitor of TOR That Prevents Age-Related Pathologies. *Science* **2010**, 327 (5970), 1223–1228.
- Lee T, Lee A, Luo L. Development of the Drosophila mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development*. **1999**, 126(18):4065-76.
- Legros, J.; Tang, G.; Gautrais, J.; Fernandez, M. P.; Trannoy, S. Long-Term Dietary Restriction Leads to Development of Alternative Fighting Strategies. *Front. Behav. Neurosci.* **2021**, 14, 599676.
- Leinwand, S. G.; Scott, K. Juvenile Hormone Drives the Maturation of Spontaneous Mushroom Body Neural Activity and Learned Behavior. *Neuron* **2021**, 109 (11),
- Li, F.; Lindsey, J. W.; Marin, E. C.; Otto, N.; Dreher, M.; Dempsey, G.; Stark, I.; Bates, A. S.; Pleijzier, M. W.; Schlegel, P.; Nern, A.; Takemura, S.-Y.; Eckstein, N.; Yang, T.; Francis, A.; Braun, A.; Parekh, R.; Costa, M.; Scheffer, L. K.; Aso, Y.; Jefferis, G. S.; Abbott, L. F.; Litwin-Kumar, A.; Waddell, S.; Rubin, G. M. The Connectome of the Adult Drosophila Mushroom Body Provides Insights into Function. *Elife* **2020**, 9, e62576.
- Li, H.; Aboudhiah, S.; Parrot, S.; Scote-Blachon, C.; Benetollo, C.; Lin, J.-S.; Seugnet, L. Pallidin Function in Drosophila Surface Glia Regulates Sleep and Is Dependent on Amino Acid Availability. *Cell Reports* **2023**, 42 (9), 113025.
- Li Y, Dharkar P, Han TH, Serpe M, Lee CH, Mayer ML. Novel functional properties of Drosophila CNS glutamate receptors. *Neuron*. **2016**, 92(5):1036-48.
- Li, Y.; Han, H.; Yin, J.; Li, T.; Yin, Y. Role of D-Aspartate on Biosynthesis, Racemization, and Potential Functions: A Mini-Review. *Anim Nutr* **2018**, 4 (3), 311–315.
- Lien, W.; Chen, Y.; Li, Y.; Wu, J.; Huang, K.; Lin, J.; Lin, S.; Hou, C.; Wang, H.; Wu, C.; Huang, S.; Chan, C. Lifespan Regulation in α/β Posterior Neurons of the Fly Mushroom Bodies by Rab27. *Aging Cell* **2020**, 19 (8), e13179.
- Lim, R. S.; Eyjólfsson, E.; Shin, E.; Perona, P.; Anderson, D. J. How Food Controls Aggression in Drosophila. *PLoS One* **2014**, 9 (8), e105626.
- Lin, C.-H.; Lin, S. Assembly of the Drosophila Mushroom Body Circuit and Its Regulation by Semaphorin 1a. *bioRxiv* **2019**, p 835595.
- Liu, C.; Ji, L.; Hu, J.; Zhao, Y.; Johnston, L. J.; Zhang, X.; Ma, X. Functional Amino Acids and Autophagy: Diverse Signal Transduction and Application. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (21), 11427.
- Liu, G. Y.; Sabatini, D. M. mTOR at the Nexus of Nutrition, Growth, Ageing and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, 21 (4), 183–203.
- Liu, W. W.; Wilson, R. I. Glutamate Is an Inhibitory Neurotransmitter in the Drosophila Olfactory System. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110 (25), 10294–10299.
- Liu, W.; Liang, X.; Gong, J.; Yang, Z.; Zhang, Y.-H.; Zhang, J.-X.; Rao, Y. Social Regulation of Aggression by Pheromonal Activation of Or65a Olfactory Neurons in Drosophila. *Nat Neurosci* **2011**, 14 (7), 896–902.
- Luo, J.; Lushchak, O. V.; Goergen, P.; Williams, M. J.; Nässel, D. R. Drosophila Insulin-Producing Cells Are Differentially Modulated by Serotonin and Octopamine Receptors and Affect Social Behavior. *PLoS One* **2014**, 9 (6), e99732.
- Ly S, Strus E, Naidoo N. Genetic disruption of the putative binding site for Homer on DmGluRA reduces sleep in Drosophila. *Sleep*. **2020**, 43(1)190.
- Ma, C.; Mirth, C. K.; Hall, M. D.; Piper, M. D. W. Amino Acid Quality Modifies the Quantitative Availability of Protein for Reproduction in Drosophila Melanogaster. *J Insect Physiol* **2022**, 139, 104050.
- Mackenzie, S. M.; Brooker, M. R.; Gill, T. R.; Cox, G. B.; Howells, A. J.; Ewart, G. D. Mutations in the White Gene of Drosophila Melanogaster Affecting ABC Transporters That Determine Eye Colouration. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1419 (2), 173–185.

- Manière, G.; Alves, G.; Berthelot-Grosjean, M.; Grosjean, Y. Growth Regulation by Amino Acid Transporters in *Drosophila* Larvae. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77* (21), 4289–4297.
- Manière, G.; Ziegler, A. B.; Geillon, F.; Featherstone, D. E.; Grosjean, Y. Direct Sensing of Nutrients via a LAT1-like Transporter in *Drosophila* Insulin-Producing Cells. *Cell Reports* **2016**, *17* (1), 137–148.
- Marcogliese PC, Deal SL, Andrews J, Harnish JM, Bhavana VH, Graves HK, *et al.* *Drosophila* functional screening of de novo variants in autism uncovers damaging variants and facilitates discovery of rare neurodevelopmental diseases. *Cell Reports* **2022**, (38), 110517
- Marin, E. C.; Büld, L.; Theiss, M.; Sarkissian, T.; Roberts, R. J. V.; Turnbull, R.; Tamimi, I. F. M.; Pleijzier, M. W.; Laursen, W. J.; Drummond, N.; Schlegel, P.; Bates, A. S.; Li, F.; Landgraf, M.; Costa, M.; Bock, D. D.; Garrity, P. A.; Jefferis, G. S. X. E. Connectomics Analysis Reveals First-, Second-, and Third-Order Thermosensory and Hygrosensory Neurons in the Adult *Drosophila* Brain. *Curr Biol* **2020**, *30* (16), 3167-3182.e4.
- Martin, J. F.; Hersperger, E.; Simcox, A.; Shearn, A. Minidiscs Encodes a Putative Amino Acid Transporter Subunit Required Non-Autonomously for Imaginal Cell Proliferation. *Mechanisms of Development* **2000**, *92* (2), 155–167.
- Masek, P.; Scott, K. Limited Taste Discrimination in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (33), 14833–14838.
- Masek, P.; Worden, K.; Aso, Y.; Rubin, G. M.; Keene, A. C. A Dopamine-Modulated Neural Circuit Regulating Aversive Taste Memory in *Drosophila*. *Current Biology* **2015**, *25* (11), 1535–1541.
- Mastroberardino, L.; Spindler, B.; Pfeiffer, R.; Skelly, P. J.; Loffing, J.; Shoemaker, C. B.; Verrey, F. Amino-Acid Transport by Heterodimers of 4F2hc/CD98 and Members of a Permease Family. *Nature* **1998**, *395* (6699), 288–291.
- Masugi-Tokita M, Flor PJ, Kawata M. Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis is Essential for Intermale Aggression. *Neuropsychopharmacol.* **2016**, *41*(3):726-35.
- Matsumoto, K.; Pinna, G.; Puia, G.; Guidotti, A.; Costa, E. Social Isolation Stress-Induced Aggression in Mice: A Model to Study the Pharmacology of Neurosteroidogenesis. *Stress* **2005**, *8* (2), 85–93.
- Mazina, M. Yu.; Kovalenko, E. V.; Vorobyeva, N. E. The Negative Elongation Factor NELF Promotes Induced Transcriptional Response of *Drosophila* Ecdysone-Dependent Genes. *Sci Rep* **2021**, *11*, 172.
- McBain, C. J.; Mayer, M. L. N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor Structure and Function. *Physiological Reviews* **1994**.
- McGuire, S. E.; Deshazer, M.; Davis, R. L. Thirty Years of Olfactory Learning and Memory Research in *Drosophila Melanogaster*. *Progress in Neurobiology* **2005**, *76* (5), 328–347.
- McNeil, A. R.; Jolley, S. N.; Akinleye, A. A.; Nurilov, M.; Rouzyi, Z.; Milunovich, A. J.; Chambers, M. C.; Simon, A. F. Conditions Affecting Social Space in *Drosophila melanogaster*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* **2015**, No. 105, e53242.
- Meinertzhagen IA, Lee CH. The Genetic Analysis of Functional Connectomics in *Drosophila*. *Advances in Genetics* **2012**, *80*, 99-151.
- Menand, B.; Desnos, T.; Nussaume, L.; Berger, F.; Bouchez, D.; Meyer, C.; Robaglia, C. Expression and Disruption of the Arabidopsis TOR (Target of Rapamycin) Gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (9), 6422–6427.
- Milkereit, R.; Persaud, A.; Vanoaica, L.; Guetg, A.; Verrey, F.; Rotin, D. LAPTM4b Recruits the LAT1-4F2hc Leu Transporter to Lysosomes and Promotes MTORC1 Activation. *Nat Commun* **2015**, *6* (1), 7250.
- Min, K.-J.; Tatar, M. Restriction of Amino Acids Extends Lifespan in *Drosophila Melanogaster*. *Mech Ageing Dev* **2006**, *127* (7), 643–646.

- Mirth, C.; Truman, J. W.; Riddiford, L. M. The Role of the Prothoracic Gland in Determining Critical Weight for Metamorphosis in *Drosophila Melanogaster*. *Current Biology* **2005**, *15* (20), 1796–1807.
- Miyashita, T.; Murakami, K.; Kikuchi, E.; Ofusa, K.; Mikami, K.; Endo, K.; Miyaji, T.; Moriyama, S.; Konno, K.; Muratani, H.; Moriyama, Y.; Watanabe, M.; Horiuchi, J.; Saitoe, M. Glia Transmit Negative Valence Information during Aversive Learning in *Drosophila*. *Science* **2023**, *382* (6677), eadf7429.
- Miyashita T, Oda Y, Horiuchi J, Yin JCP, Morimoto T, Saitoe M. Mg²⁺ Block of *Drosophila* NMDA Receptors Is Required for Long-Term Memory Formation and CREB-Dependent Gene Expression. *Neuron*. **2012**, *74*(5):887-98.
- Mohamed, A. A. M.; Hansson, B. S.; Sachse, S. Third-Order Neurons in the Lateral Horn Enhance Bilateral Contrast of Odor Inputs Through Contralateral Inhibition in *Drosophila*. *Front Physiol* **2019**, *10*, 851.
- Molina-Obando S, Vargas-Fique JF, Henning M, Gür B, Schladt TM, Akhtar J, et al. ON selectivity in the *Drosophila* visual system is a multisynaptic process involving both glutamatergic and GABAergic inhibition. *Elife*. **2019**, *8*:e49373.
- Muria, A.; Musso, P.-Y.; Durrieu, M.; Portugal, F. R.; Ronsin, B.; Gordon, M. D.; Jeanson, R.; Isabel, G. Social Facilitation of Long-Lasting Memory Is Mediated by CO₂ in *Drosophila*. *Current Biology* **2021**, *31* (10), 2065-2074.e5.
- Musso, P.-Y.; Junca, P.; Gordon, M. D. A Neural Circuit Linking Two Sugar Sensors Regulates Satiety-Dependent Fructose Drive in *Drosophila*. *Sci Adv* **2021**, *7* (49), eabj0186.
- Nakai, J.; Ohkura, M.; Imoto, K. A High Signal-to-Noise Ca²⁺ Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein. *Nat Biotechnol* **2001**, *19* (2), 137–141.
- Nakamura, E.; Sato, M.; Yang, H.; Miyagawa, F.; Harasaki, M.; Tomita, K.; Matsuoka, S.; Noma, A.; Iwai, K.; Minato, N. 4F2 (CD98) Heavy Chain Is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer. *J Biol Chem* **1999**, *274* (5), 3009–3016.
- Nässel DR, Kubrak OL, Liu Y, Luo J, Lushchak OV. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Front Physiol*. **2013**, *4*:252.
- Neuser, K.; Triphan, T.; Mronz, M.; Poeck, B.; Strauss, R. Analysis of a Spatial Orientation Memory in *Drosophila*. *Nature* **2008**, *453* (7199), 1244–1247.
- Nilsen, S. P.; Chan, Y.-B.; Huber, R.; Kravitz, E. A. Gender-Selective Patterns of Aggressive Behavior in *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (33), 12342–12347.
- O’Kane, C. J. *Drosophila* as a Model Organism for the Study of Neuropsychiatric Disorders. In *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*; Hagan, J. J., Ed.; Current Topics in Behavioral Neurosciences; SpRinger Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**; Vol. 7, pp 37–60.
- O’Kane, C. J.; Gehring, W. J. Detection in Situ of Genomic Regulatory Elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (24), 9123–9127.
- Ohgaki, R. *et al.* Essential Roles of L-Type Amino Acid Transporter 1 in Syncytiotrophoblast Development by Presenting Fusogenic 4F2hc. *Mol Cell Biol* **2017**, *37*, e00427-16.
- Ohtsuki, S.; Yamaguchi, H.; Kang, Y.-S.; Hori, S.; Terasaki, T. Reduction of L-Type Amino Acid Transporter 1 mRNA Expression in Brain Capillaries in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2010**, *33* (7), 1250–1252.
- Okano, N.; Kawai, K.; Yamauchi, Y.; Kobayashi, T.; Naruge, D.; Nagashima, F.; Endou, H.; Furuse, J. First-in-Human Phase I study of JPH203 in Patients with Advanced Solid Tumors. *JCO* **2018**, *36* (4_suppl), 419–419.
- Otani, R.; Takigawa, H.; Yuge, R.; Shimizu, D.; Ariyoshi, M.; Miyamoto, R.; Kadota, H.; Hiyama, Y.; Hayashi, R.; Urabe, Y.; Ishikawa, A.; Oue, N.; Kitadai, Y.; Oka, S.; Tanaka, S. The Anti-Tumor Effect of the Newly Developed LAT1 Inhibitor JPH203 in

- Colorectal Carcinoma, According to a Comprehensive Analysis. *Cancers (Basel)* **2023**, *15* (5), 1383.
- Owald, D.; Felsenberg, J.; Talbot, C. B.; Das, G.; Perisse, E.; Huetteroth, W.; Waddell, S. Activity of Defined Mushroom Body Output Neurons Underlies Learned Olfactory Behavior in *Drosophila*. *Neuron* **2015**, *86* (2), 417–427.
- Park, A.; Croset, V.; Otto, N.; Agarwal, D.; Treiber, C. D.; Meschi, E.; Sims, D.; Waddell, S. Gliotransmission of D-Serine Promotes Thirst-Directed Behaviors in *Drosophila*. *Curr Biol* **2022**, *32* (18), 3952-3970.e8.
- Park, G.; Fukasawa, K.; Horie, T.; Masuo, Y.; Inaba, Y.; Tatsuno, T.; Yamada, T.; Tokumura, K.; Iwahashi, S.; Iezaki, T.; Kaneda, K.; Kato, Y.; Ishigaki, Y.; Mieda, M.; Tanaka, T.; Ogawa, K.; Ochi, H.; Sato, S.; Shi, Y.-B.; Inoue, H.; Lee, H.; Hinoi, E. L-Type Amino Acid Transporter 1 in Hypothalamic Neurons in Mice Maintains Energy and Bone Homeostasis. *JCI Insight* **2023**, *8* (7), e154925.
- Parker, L.; Howlett, I. C.; Rusan, Z. M.; Tanouye, M. A. Seizure and Epilepsy: Studies of Seizure Disorders in *Drosophila*. *Int Rev Neurobiol* **2011**, *99*, 1–21.
- Parmentier ML, Galvez T, Acher F, Peyre B, Pellicciari R, Grau Y, et al. Conservation of the ligand recognition site of metabotropic glutamate receptors during evolution. *Neuropharmacology*. **2000**, *39*(7):1119-31.
- Parmentier ML, Joly C, Restituto S, Bockaert J, Grau Y, Pin JP. The G protein-coupling profile of metabotropic glutamate receptors, as determined with exogenous G proteins, is independent of their ligand recognition domain. *Mol Pharmacol*. **1998**, *53*(4):778-86.
- Parmentier, M.-L.; Pin, J.-P.; Bockaert, J.; Grau, Y. Cloning and Functional Expression of a *Drosophila* Metabotropic Glutamate Receptor Expressed in the Embryonic CNS. *J. Neurosci*. **1996**, *16* (21), 6687–6694.
- Perisse, E.; Yin, Y.; Lin, A. C.; Lin, S.; Huetteroth, W.; Waddell, S. Different Kenyon Cell Populations Drive Learned Approach and Avoidance in *Drosophila*. *Neuron* **2013**, *79* (5), 945–956.
- Pfeiffer, R.; Spindler, B.; Loffing J.; Skelly, P.J.; Shoemaker, C.B.; Verrey, F. Functional Heterodimeric Amino Acid Transporters Lacking Cysteine Residues Involved in Disulfide Bond. *FEBS Letters* **1998**.
- Pinheiro P, Mulle C. Kainate receptors. *Cell Tissue Res*. **2006**, *326*(2):457-82.
- Piper, M. D. W.; Soultoukis, G. A.; Blanc, E.; Mesaros, A.; Herbert, S. L.; Juricic, P.; He, X.; Atanassov, I.; Salmonowicz, H.; Yang, M.; Simpson, S. J.; Ribeiro, C.; Partridge, L. Matching Dietary Amino Acid Balance to the In Silico-Translated Exome Optimizes Growth and Reproduction without Cost to Lifespan. *Cell Metab* **2017**, *25* (3), 610–621.
- Piyankarage, S. C., Augustin, H., Grosjean, Y., Featherstone, D. E. & Shippy, S. A. Hemolymph Amino Acid Analysis of Individual *Drosophila* Larvae. *Anal Chem* **2008**, *80*, 1201–1207.
- Pizzagalli, M. D.; Bensimon, A.; Superti-Furga, G. A Guide to Plasma Membrane Solute Carrier Proteins. *The FEBS Journal* **2021**, *288* (9), 2784–2835.
- Plaçais, P.-Y.; de Tredern, É.; Scheunemann, L.; Trannoy, S.; Goguel, V.; Han, K.-A.; Isabel, G.; Preat, T. Upregulated Energy Metabolism in the *Drosophila* Mushroom Body Is the Trigger for Long-Term Memory. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 15510.
- Plaitakis, A.; Kalef-Ezra, E.; Kotzamani, D.; Zaganas, I.; Spanaki, C. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology* **2017**, *6* (4), 11.
- Prager, G. W.; Féral, C. C.; Kim, C.; Han, J.; Ginsberg, M. H. CD98hc (SLC3A2) Interaction with the Integrin Beta Subunit Cytoplasmic Domain Mediates Adhesive Signaling. *J Biol Chem* **2007**, *282* (33), 24477–24484.

- Rebelo, A. R.; Homem, C. C. F. DMyc-Dependent Upregulation of CD98 Amino Acid Transporters Is Required for Drosophila Brain Tumor Growth. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2023**, *80* (1).
- Reinhard, N.; Schubert, F. K.; Bertolini, E.; Hagedorn, N.; Manoli, G.; Sekiguchi, M.; Yoshii, T.; Rieger, D.; Helfrich-Förster, C. The Neuronal Circuit of the Dorsal Circadian Clock Neurons in Drosophila Melanogaster. *Front. Physiol.* **2022**, *13*.
- Reiter, L. T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in Drosophila Melanogaster. *Genome Res* **2001**, *11* (6), 1114–1125.
- Reynolds, B.; Roversi, P.; Laynes, R.; Kazi, S.; Boyd, C. A. R.; Goberdhan, D. C. I. Drosophila Expresses a CD98 Transporter with an Evolutionarily Conserved Structure and Amino Acid-Transport Properties. *Biochemical Journal* **2009**, *420* (3), 363–372.
- Richard, D. M.; Dawes, M. A.; Mathias, C. W.; Acheson, A.; Hill-Kapturczak, N.; Dougherty, D. M. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res* **2009**, *2*, 45–60.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.* **2003**, *140*(1-2):1-47.
- Riemensperger T, Issa AR, Pech U, Coulom H, Nguyễn MV, Cassar M, et al. A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a Drosophila model of Parkinson disease. *Cell Rep* **2013**, *5*(4):952-60.
- Rooke, R.; Rasool, A.; Schneider, J.; Levine, J. D. Drosophila Melanogaster Behaviour Changes in Different Social Environments Based on Group Size and Density. *Commun Biol* **2020**, *3* (1), 304.
- Scheffer, L. K.; Xu, C. S.; Januszewski, M.; Lu, Z.; et al. A Connectome and Analysis of the Adult Drosophila Central Brain. *eLife* **2020**, *9*, e57443.
- Séjourné, J.; Plaçais, P.-Y.; Aso, Y.; Siwanowicz, I.; Trannoy, S.; Thoma, V.; Tedjakumala, S. R.; Rubin, G. M.; Tchénio, P.; Ito, K.; Isabel, G.; Tanimoto, H.; Preat, T. Mushroom Body Efferent Neurons Responsible for Aversive Olfactory Memory Retrieval in Drosophila. *Nat Neurosci* **2011**, *14* (7), 903–910.
- Serway, C. N.; Kaufman, R. R.; Serway, C. N.; Kaufman, R. R.; Strauss, R.; Steven de Belle, J. Mushroom Bodies Enhance Initial Motor Activity in Drosophila. *Journal of Neurogenetics* **2009**, *23* (1–2), 173–184.
- Shearn, A. & Garen, A. Genetic control of imaginal disc development in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71*, 1393–1397.
- Shearn, A., Rice, T., Garen, A. & Gehring, W. Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, *68*, 2594–2598.
- Shen, P.; Wan, X.; Wu, F.; Shi, K.; Li, J.; Gao, H.; Zhao, L.; Zhou, C. Neural Circuit Mechanisms Linking Courtship and Reward in Drosophila Males. *Curr Biol* **2023**, *33* (10), 2034-2050.e8.
- Shih, M.-F. M.; Davis, F. P.; Henry, G. L.; Dubnau, J. Nuclear Transcriptomes of the Seven Neuronal Cell Types That Constitute the Drosophila Mushroom Bodies. *G3 (Bethesda)* **2018**, *9* (1), 81–94.
- Shim, J.; Gururaja-Rao, S.; Banerjee, U. Nutritional Regulation of Stem and Progenitor Cells in Drosophila. *Development* **2013**, *140* (23), 4647–4656.
- Shleper, M.; Kartvelishvily, E.; Wolosker, H. D-Serine Is the Dominant Endogenous Coagonist for NMDA Receptor Neurotoxicity in Organotypic Hippocampal Slices. *J Neurosci* **2005**, *25* (41), 9413–9417.
- Siju, K. P.; Štih, V.; Aimon, S.; Gjorgjieva, J.; Portugues, R.; Grunwald Kadow, I. C. Valence and State-Dependent Population Coding in Dopaminergic Neurons in the Fly Mushroom Body. *Curr Biol* **2020**, *30* (11), 2104-2115.e4.

- Simon, A. F.; Chou, M.-T.; Salazar, E. D.; Nicholson, T.; Saini, N.; Metchev, S.; Krantz, D. E. A Simple Assay to Study Social Behavior in *Drosophila*: Measurement of Social Space within a Group. *Genes, Brain and Behavior* **2012**, *11* (2), 243–252.
- Simonnet. Rôle du transporteur d'acides aminés Minidiscs dans le fonctionnement du système nerveux chez *Drosophila melanogaster*. *Thèse de doctorat, Université de Bourgogne Franche Comté– Dijon*, **2015**. TEL archives ouvertes (04170825).
- Sinakevitch, I.; Grau, Y.; Strausfeld, N. J.; Birman, S. Dynamics of Glutamatergic Signaling in the Mushroom Body of Young Adult *Drosophila*. *Neural Dev* **2010**, *5* (1), 10.
- Stocker, H.; Gallant, P. Getting Started: An Overview on Raising and Handling *Drosophila*. *Methods Mol Biol* **2008**, *420*, 27–44.
- Slepian, Z.; Sundby, K.; Glier, S.; McDaniels, J.; Nystrom, T.; Mukherjee, S.; Acton, S.; Condron, B. Visual Attraction in *Drosophila* Larvae Develops during a Critical Period and Is Modulated by Crowding Conditions. *Journal of comparative physiology* **2015**, *201*.
- Song, Q.; Feng, G.; Zhang, J.; Xia, X.; Ji, M.; Lv, L.; Ping, Y. NMDA Receptor-Mediated Ca²⁺ Influx in the Absence of Mg²⁺ Block Disrupts Rest: Activity Rhythms in *Drosophila*. *Sleep* **2017**, *40* (12).
- Srivastava, A.; Lu, J.; Gadalla, D. S.; Hendrich, O.; Grönke, S.; Partridge, L. The Role of GCN2 Kinase in Mediating the Effects of Amino Acids on Longevity and Feeding Behaviour in *Drosophila*. *Frontiers in Aging* **2022**, *3*.
- Strausfeld, N. J.; Hansen, L.; Li, Y.; Gomez, R. S.; Ito, K. Evolution, Discovery, and Interpretations of Arthropod Mushroom Bodies. *Learn Mem* **1998**, *5* (1–2), 11–37.
- Suh, Y. H.; Chang, K.; Roche, K. W. Metabotropic Glutamate Receptor Trafficking. *Mol Cell Neurosci* **2018**, *91*, 10–24.
- Sun, J.; Xu, A. Q.; Giraud, J.; Poppinga, H.; Riemensperger, T.; Fiala, A.; Birman, S. Neural Control of Startle-Induced Locomotion by the Mushroom Bodies and Associated Neurons in *Drosophila*. *Frontiers in Systems Neuroscience* **2018**, *12*.
- Sun, Y.; Qiu, R.; Li, X.; Cheng, Y.; Gao, S.; Kong, F.; Liu, L.; Zhu, Y. Social Attraction in *Drosophila* Is Regulated by the Mushroom Body and Serotonergic System. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 5350.
- Sundberg BE, Wååg E, Jacobsson JA, Stephansson O, Rumaks J, Svirskis S, et al. The Evolutionary History and Tissue Mapping of Amino Acid Transporters Belonging to Solute Carrier Families SLC32, SLC36, and SLC38. *J Mol Neurosci*. **2008**, *35*(2):179-93.
- Takahashi, A. The Role of Social Isolation Stress in Escalated Aggression in Rodent Models. *Neurosci Res* **2022**, S0168-0102(22)00212-7.
- Takemura, S.; Aso, Y.; Hige, T.; Wong, A.; Lu, Z.; Xu, C. S.; Rivlin, P. K.; Hess, H.; Zhao, T.; Parag, T.; Berg, S.; Huang, G.; Katz, W.; Olbris, D. J.; Plaza, S.; Umayam, L.; Aniceto, R.; Chang, L.-A.; Lauchie, S.; Ogundeyi, O.; Ordish, C.; Shinomiya, A.; Sigmund, C.; Takemura, S.; Tran, J.; Turner, G. C.; Rubin, G. M.; Scheffer, L. K. A Connectome of a Learning and Memory Center in the Adult *Drosophila* Brain. *eLife* **2017**, *6*, e26975.
- Tan, D. J. L.; Dvinge, H.; Christoforou, A.; Bertone, P.; Martinez Arias, A.; Lilley, K. S. Mapping Organelle Proteins and Protein Complexes in *Drosophila Melanogaster*. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 2667–2678.
- Tărlungeanu, D. C.; Deliu, E.; Dotter, C. P.; Kara, M.; Janiesch, P. C.; Scalise, M.; Galluccio, M.; Tesulov, M.; Morelli, E.; Sonmez, F. M.; Bilguvar, K.; Ohgaki, R.; Kanai, Y.; Johansen, A.; Esharif, S.; Ben-Omran, T.; Topcu, M.; Schlessinger, A.; Indiveri, C.; Duncan, K. E.; Caglayan, A. O.; Gunel, M.; Gleeson, J. G.; Novarino, G. Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder. *Cell* **2016**, *167* (6), 1481-1494.e18.
- Tatar, M. The Plate Half-Full: Status of Research on the Mechanisms of Dietary Restriction in *Drosophila Melanogaster*. *Exp Gerontol* **2011**, *46* (5), 363–368.
- Technau, G.; Heisenberg, M. Neural Reorganization during Metamorphosis of the Corpora Pedunculata in *Drosophila Melanogaster*. *Nature* **1982**, *295* (5848), 405–407.

- Texada, M. J.; Koyama, T.; Rewitz, K. Regulation of Body Size and Growth Control. *Genetics* **2020**, *216* (2), 269–313.
- Tomer, R.; Denes, A. S.; Tessmar-Raible, K.; Arendt, D. Profiling by Image Registration Reveals Common Origin of Annelid Mushroom Bodies and Vertebrate Pallium. *Cell* **2010**, *142* (5), 800–809.
- Trannoy, S. & Kravitz, E. A. Strategy changes in subsequent fights as consequences of winning and losing in fruit fly fights. *Fly (Austin)* **2017**, *11*, 129–138.
- Trannoy S, Chowdhury B, Kravitz EA. Handling alters aggression and « loser » effect formation in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem.* **2015a**, *22*(2):64-8.
- Trannoy, S.; Chowdhury, B.; Kravitz, E. A. A New Approach That Eliminates Handling for Studying Aggression and the “Loser” Effect in *Drosophila Melanogaster*. *JoVE* **2015b**, No. 106, 53395.
- Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K.; Hansen, K. B.; Yuan, H.; Myers, S. J.; Dingledine, R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* **2010**, *62* (3), 405–496.
- Truman, J. W.; Price, J.; Miyares, R. L.; Lee, T. Metamorphosis of Memory Circuits in *Drosophila* Reveals a Strategy for Evolving a Larval Brain. *Elife* **2023**, *12*, e80594.
- Tsao, C.-H.; Chen, C.-C.; Lin, C.-H.; Yang, H.-Y.; Lin, S. *Drosophila* Mushroom Bodies Integrate Hunger and Satiety Signals to Control Innate Food-Seeking Behavior. *eLife* **2018**, *7*, e35264.
- Tsumura H, Suzuki N, Saito H, Kawano M, Otake S, Kozuka Y, et al. The targeted disruption of the CD98 gene results in embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **2003**, *308*(4):847-51.
- Ueda, A.; Wu, C.-F. Effects of Social Isolation on Neuromuscular Excitability and Aggressive Behaviors in *Drosophila*: Altered Responses by Hk and Gsts1, Two Mutations Implicated in Redox Regulation. *Journal of Neurogenetics* **2009**, *23* (4), 378–394.
- Verrey, F.; Closs, E. I.; Wagner, C. A.; Palacin, M.; Endou, H.; Kanai, Y. CATs and HATs: The SLC7 Family of Amino Acid Transporters. *Pflugers Arch* **2004**, *447* (5), 532–542.
- Vogt, K.; Schnaitmann, C.; Dylla, K. V.; Knapek, S.; Aso, Y.; Rubin, G. M.; Tanimoto, H. Shared Mushroom Body Circuits Underlie Visual and Olfactory Memories in *Drosophila*. *eLife* **2014**, *3*, e02395.
- Vömel, M.; Wegener, C. Neuroarchitecture of Aminergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila Melanogaster*. *PLOS ONE* **2008**, *3* (3), e1848.
- Vora, A.; Nguyen, A. D.; Spicer, C.; Li, W. The Impact of Social Isolation on Health and Behavior in *Drosophila Melanogaster* and Beyond. *Brain Science Advances* **2022**, *8* (3), 183–196.
- Wagner, C. A.; Lang, F.; Bröer, S. Function and Structure of Heterodimeric Amino Acid Transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **2001**, *281* (4), C1077-1093.
- Wang, L.; Anderson, D. J. Identification of an Aggression-Promoting Pheromone and Its Receptor Neurons in *Drosophila*. *Nature* **2010**, *463* (7278), 227–231.
- Wang, L.; Han, X.; Mehren, J.; Hiroi, M.; Billeter, J.-C.; Miyamoto, T.; Amrein, H.; Levine, J. D.; Anderson, D. J. Hierarchical Chemosensory Regulation of Male-Male Social Interactions in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **2011**, *14* (6), 757–762.
- Wolff, T., Iyer, N. A. & Rubin, G. M. Neuroarchitecture and neuroanatomy of the *Drosophila* central complex: A GAL4-based dissection of protocerebral bridge neurons and circuits. *Journal of Comparative Neurology* **2015**, *523*, 997–1037.
- Wolosker, H.; Balu, D. T. D-Serine as the Gatekeeper of NMDA Receptor Activity: Implications for the Pharmacologic Management of Anxiety Disorders. *Transl Psychiatry* **2020**, *10* (1), 1–10.
- Wu CL, Shih MFM, Lee PT, Chiang AS. An Octopamine-Mushroom Body Circuit Modulates the Formation of Anesthesia-Resistant Memory in *Drosophila*. *Current Biology.* **2013**, *23*(23):2346-54.

- Wu, C.-L.; Xia, S.; Fu, T.-F.; Wang, H.; Chen, Y.-H.; Leong, D.; Chiang, A.-S.; Tully, T. Specific Requirement of NMDA Receptors for Long-Term Memory Consolidation in *Drosophila* Ellipsoid Body. *Nat Neurosci* **2007**, *10* (12), 1578–1586.
- Wu, G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. *Advances in Nutrition* **2010**, *1* (1), 31–37.
- Wu, J.-K.; Tai, C.-Y.; Feng, K.-L.; Chen, S.-L.; Chen, C.-C.; Chiang, A.-S. Long-Term Memory Requires Sequential Protein Synthesis in Three Subsets of Mushroom Body Output Neurons in *Drosophila*. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 7112.
- Xia, S.; Chiang, A.-S. NMDA Receptors in *Drosophila*. In *Biology of the NMDA Receptor*; Van Dongen, A. M., Ed.; Frontiers in Neuroscience **2009**. CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton (FL).
- Xia, S.; Miyashita, T.; Fu, T.-F.; Lin, W.-Y.; Wu, C.-L.; Pyzocha, L.; Lin, I.-R.; Saitoe, M.; Tully, T.; Chiang, A.-S. NMDA Receptors Mediate Olfactory Learning and Memory in *Drosophila*. *Current Biology* **2005**, *15* (7), 603–615.
- Xie, T.; Ho, M. C. W.; Liu, Q.; Horiuchi, W.; Lin, C.-C.; Task, D.; Luan, H.; White, B. H.; Potter, C. J.; Wu, M. N. A Genetic Toolkit for Dissecting Dopamine Circuit Function in *Drosophila*. *Cell Rep* **2018**, *23* (2), 652–665.
- Yagi, R.; Mabuchi, Y.; Mizunami, M.; Tanaka, N. K. Convergence of Multimodal Sensory Pathways to the Mushroom Body Calyx in *Drosophila Melanogaster*. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 29481.
- Yang, Z.; Huang, R.; Fu, X.; Wang, G.; Qi, W.; Mao, D.; Shi, Z.; Shen, W. L.; Wang, L. A Post-Ingestive Amino Acid Sensor Promotes Food Consumption in *Drosophila*. *Cell Res* **2018**, *28* (10), 1013–1025.
- Yost, R. T.; Robinson, J. W.; Baxter, C. M.; Scott, A. M.; Brown, L. P.; Aletta, M. S.; Hakimjavadi, R.; Lone, A.; Cumming, R. C.; Dukas, R.; Mozer, B.; Simon, A. F. Abnormal Social Interactions in a *Drosophila* Mutant of an Autism Candidate Gene: Neuroligin 3. *IJMS* **2020**, *21* (13), 4601.
- Youn, H.; Kirkhart, C.; Chia, J.; Scott, K. A Subset of Octopaminergic Neurons That Promotes Feeding Initiation in *Drosophila Melanogaster*. *PLoS One* **2018**, *13* (6), e0198362.
- Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A. C. & Kravitz, E. A. Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 17519–17524.
- Zarubin, M.; Yakhnenko, A.; Kravchenko, E. Transcriptome Analysis of *Drosophila Melanogaster* Laboratory Strains of Different Geographical Origin after Long-Term Laboratory Maintenance. *Ecology and Evolution* **2020**, *10* (14), 7082–7093.
- Zhang, J.; Xu, Y.; Li, D.; Fu, L.; Zhang, X.; Bao, Y.; Zheng, L. Review of the Correlation of LAT1 With Diseases: Mechanism and Treatment. *Front Chem* **2020**, *8*, 564809.
- Zhang, Y.; Zhang, Y.; Sun, K.; Meng, Z.; Chen, L. The SLC Transporter in Nutrient and Metabolic Sensing, Regulation, and Drug Development. *Journal of Molecular Cell Biology* **2019**, *11* (1), 1–13.
- Zhao X, Karpac J. Glutamate metabolism directs energetic trade-offs to shape host-pathogen susceptibility in *Drosophila*. *Cell Metab.* **2021**, *33*(12):2428-2444.e8.
- Zhao, X. L.; Campos, A. R. Insulin Signalling in Mushroom Body Neurons Regulates Feeding Behaviour in *Drosophila Larvae*. *Journal of Experimental Biology* **2012**, *215* (15), 2696–2702.
- Zheng, Z.; Lauritzen, J. S.; Perlman, E.; Robinson, C. G.; Nichols, M.; Milkie, D.; Torrens, O.; Price, J.; Fisher, C. B.; Sharifi, N.; Calle-Schuler, S. A.; Kmecova, L.; Ali, I. J.; Karsh, B.; Trautman, E. T.; Bogovic, J. A.; Hanslovsky, P.; Jefferis, G. S. X. E.; Kazhdan, M.; Khairy, K.; Saalfeld, S.; Fetter, R. D.; Bock, D. D. A Complete Electron Microscopy Volume of the Brain of Adult *Drosophila Melanogaster*. *Cell* **2018**, *174* (3), 730-743.e22.
- Ziegler, A. B.; Manière, G.; Grosjean, Y. Jhl-21 Plays a Role in *Drosophila* Insulin-like Peptide Release from Larval IPCs via Leucine Transport. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 1908.

- Zimmerman, J. E.; Chan, M. T.; Jackson, N.; Maislin, G.; Pack, A. I. Genetic Background Has a Major Impact on Differences in Sleep Resulting from Environmental Influences in *Drosophila*. *Sleep* **2012**, *35* (4), 545–557.
- Zoicas, I.; Kornhuber, J. The Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Social Behavior in Rodents. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (6), 1412.
- Zwarts, L.; Magwire, M. M.; Carbone, M. A.; Versteven, M.; Herteleer, L.; Anholt, R. R. H.; Callaerts, P.; Mackay, T. F. C. Complex Genetic Architecture of *Drosophila* Aggressive Behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (41),
- Zwarts, L.; Vanden Broeck, L.; Cappuyns, E.; Ayroles, J. F.; Magwire, M. M.; Vulsteke, V.; Clements, J.; Mackay, T. F. C.; Callaerts, P. The Genetic Basis of Natural Variation in Mushroom Body Size in *Drosophila Melanogaster*. *Nat Commun* **2015**, *6* (1), 10115.

Annexes

Résumé grand public

Les organismes interagissent avec leur environnement et intègrent divers signaux pour assurer leur survie et leur reproduction. Cela met en jeu des mécanismes de détection complexes, notamment le système chimio-sensoriel, ainsi que la sensibilité des organes aux signaux internes pour maintenir l'homéostasie. Nos travaux de recherche révèlent l'expression d'un transporteur d'acides aminés, appelé Minidiscs (MND), dans le cerveau adulte, en particulier dans une structure appelée les Corps Pédonculés (CPs) où il joue un rôle crucial dans la réponse neuronale à certains acides aminés. Nos résultats suggèrent que les CPs peuvent détecter directement certains acides aminés via MND, ce qui en fait un centre de détection du statut nutritionnel interne. De plus, MND est impliqué dans la réponse au glutamate, un neurotransmetteur, via des récepteurs spécifiques nommés NMDARs. Enfin, nos résultats indiquent que l'activité des CPs en réponse au glutamate peut varier en fonction du contexte social et de manière dépendante de MND, soulignant l'impact de l'environnement sur l'activité neuronale. Ainsi, ces résultats mettent en lumière le rôle des transporteurs d'acides aminés dans la capacité des neurones à répondre aux signaux internes et externes.

General public abstract

Organisms interact with their environment and integrate various signals to ensure their survival and reproduction. This involves complex detection mechanisms, including the chemosensory system, as well as organ sensitivity to internal signals to maintain homeostasis. Our research reveals the expression of an amino acid transporter, called Minidiscs (MND), in the adult brain, particularly in a structure called the Mushroom Bodies (MBs), where it plays a crucial role in neuronal response to specific amino acids. Our findings suggest that MBs can directly detect certain amino acids via MND, making it a center for sensing internal nutritional status. Additionally, MND is involved in the response to glutamate, a neurotransmitter, via specific receptors called NMDARs. Finally, our results indicate that MBs activity in response to glutamate may be different depending on social context and be dependent on MND, highlighting the impact of the environment on neuronal activity. Thus, these results emphasize the role of amino acid transporters in the ability of neurons to respond to internal and external signals.

Résumé

Chaque organisme vivant évolue dans son écosystème, où il doit être capable de détecter et d'intégrer de multiples facteurs environnementaux (température, hygrométrie, composés chimiques organiques ou non...). Ces signaux jouent un rôle important dans la communication entre organismes. Chaque individu doit donc mettre en lien ces stimuli externes avec ses propres signaux internes (nutritionnel, métabolique, hormonal, infection...), et adapter son comportement en conséquence pour assurer sa survie et sa reproduction. Pour ce faire des mécanismes complexes de détection se sont développés, notamment le système chimio-sensoriel, permettant la réception et la discrimination de molécules chimiques externes. En parallèle, des organes internes sont sensibles aux signaux internes afin de détecter des carences et de contrôler l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Ces processus sont notamment possibles grâce à des protéines transmembranaires qui sont spécialisées dans la réception et/ou le transport d'autres molécules comme les acides aminés (AAs), indispensables à tous les types cellulaires tels que les cellules du système nerveux.

Nos travaux de recherche montrent qu'un transporteur d'AAs appartenant à la famille des Solute carrier 7A (SLC7A) nommé Minidiscs (MND) est exprimé dans le cerveau adulte, au niveau des neurones et des cellules gliales. Cette protéine semble se localiser au niveau de la membrane plasmique et de la membrane du réticulum endoplasmique. MND est exprimé dans les neurones formant une structure particulière du cerveau appelée Corps Pédonculés (CPs) et joue un rôle clef dans la réponse de ces neurones à certains L-AAs (L-Asp, L-Arg, L-Glu, L-Lys, L-Ile, L-Leu et L-Thr). Ce résultat démontre ainsi que des transporteurs de la famille des SLC7As sont impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones. De plus, cela suggère que les CPs peuvent détecter directement des L-AAs via MND, faisant de cette structure un centre de détection du statut interne nutritionnel de l'individu. La réponse de ces neurones à la L-Leucine MND dépendante fait intervenir la voie de signalisation passant par TOR, mais n'implique pas la Glutamate Deshydrogenase (GDH). De par sa présence au sein des CPs, MND pourrait potentiellement moduler les comportements associés à cette structure, tels que la mémoire olfactive, l'agressivité... Cependant, nos études comportementales semblent indiquer que la présence de MND dans tous les neurones des CPs n'est pas requise pour la modulation du comportement d'agressivité territoriale des mâles.

Mes données indiquent également que MND est requis pour la réponse des CPs au L-Glutamate, qui est aussi un neurotransmetteur. MND étant décrit comme transporteur de L-AAs non chargés et que le L-Glutamate est, dans sa forme physiologique un AA chargé négativement, des partenaires de MND sont potentiellement impliqués dans cette activation. Cinq types de récepteurs au L-Glutamate sont présents dans les mêmes neurones des CPs exprimant MND : NMDAR1, NMDAR2, KAIR1D, mGluR et GluCl α . Il a été possible de montrer que l'activation des CPs via le récepteur NMDAR1 est dépendante de la présence de MND. Toutefois, cette voie de détection de signaux glutamatergiques ne semble pas intervenir dans la régulation du comportement d'agressivité. Nous montrons également que l'activité des CPs en réponse au glutamate qui est dépendante de NMDAR1 semble différer suivant le contexte social. En effet, une réponse plus intense a été observée chez les mâles isolés socialement par rapport aux mâles groupés. Cette réponse au glutamate impliquant NMDAR1 pourrait dépendre de la détection chronique du 11-*cis*-Vaccenyl Acétate (cVA), une phéromone mâle, suggérant ainsi que l'environnement social joue un rôle sur l'activité des CPs.

Ainsi, pris dans leur ensemble, mes résultats montrent que des transporteurs d'acides aminés de type SLC interviennent dans la capacité des neurones à répondre aux AAs comme la L-Leucine et aux neurotransmetteurs comme le glutamate.

Abstract

Every living organism lives in an ecosystem, where it needs to detect and integrate many environmental factors (temperature, humidity, organic or inorganic chemical compounds...). These signals play an important role in the communication between organisms. Each individual must combine these external stimuli with its own internal signals (nutritional, metabolic, hormonal, infectious...), and adapt its behavior to ensure its survival and reproduction. To achieve this, complex detection mechanisms have been developed, including the chemosensory system, which allows the reception and discrimination of external chemical molecules. Internal organs are sensitive to internal signals to detect deficiencies and control cellular and tissue homeostasis. These processes are made possible by transmembrane proteins that specialize in detecting and/or transporting other molecules such as amino acids (AAs), which are essential for all cell types, including neurons.

My research focuses on an amino acid transporter belonging to the SLC7A family called Minidiscs (MND) and we have shown that MND is expressed in the adult brain, in neurons and glial cells. This protein appears to be localized at the plasma membrane and the endoplasmic reticulum. MND is expressed in neurons that form a specific brain structure called Mushroom Bodies (MBs) and plays a key role in the response of these neurons to several L-amino acids (L-Asp, L-Arg, L-Glu, L-Lys, L-Ile, L-Leu, and L-Thr). This result demonstrates that SLC7A transporters are involved in controlling neuron activity and suggests that MBs can directly detect L-amino acids via MND. This makes this structure a center for detecting the internal nutritional status of the individual. The response of these neurons to L-Leucine MND-dependent involves a TOR pathway and not a GDH one. Because of its localization within the MBs, MND may potentially modulate behaviors associated with this structure. However, the presence of MND in all MB neurons is not required for the modulation of male territorial aggressive behavior.

My results also show that MND is required for the response of the MBs to L-Glutamate which is also a neurotransmitter. MND is described as a transporter of uncharged L-amino acids and not L-Glutamate which is a negatively charged AA. Five L-Glutamate receptors are expressed in the MB neurons expressing MND: NMDAR1, NMDAR2, KAIR1D, mGluR, and GluCl α . We have shown that MB activation via the NMDAR1 receptor is MND dependent. This glutamatergic signaling pathway does

not appear to be involved in the regulation of aggressive behavior. However, MB activity in response to glutamate involving NMDAR1 appears to be modulated by the social environment. Thus, the response of the MBs is increased in isolated males compared to grouped males. This glutamate response via NMDAR1 could depend on the chronic detection of 11-*cis*-Vaccenyl Acetate (cVA), a male pheromone. This suggests that the social environment influences the MB activity.

Thus, my results show that SLC-type amino acid transporters are involved in the ability of neurons to respond to neurotransmitters, such as glutamate and AAs.

Article :

**“A LAT1-like amino acid transporter regulates neuronal activity in the
Drosophila mushroom bodies.”**

*Julie Delescluse, Mégane Simonnet, Anna Barbara Ziegler, Kévin Piffaretti, Georges
Alves, Yaël Grosjean and Gérard Manière.*

Article

A LAT1-Like Amino Acid Transporter Regulates Neuronal Activity in the *Drosophila* Mushroom Bodies

Julie Delescluse ¹, Mégane M. Simonnet ¹, Anna B. Ziegler ^{1,2}, Kévin Piffaretti ¹, Georges Alves ¹, Yael Grosjean ^{1,*} and Gérard Manière ^{1,*}

¹ Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRAE, Institut Agro, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France

² Institute for Neuro- and Behavioral Biology, University of Münster, 48149 Münster, Germany

* Correspondence: yael.grosjean@u-bourgogne.fr (Y.G.); gerard.maniere@u-bourgogne.fr (G.M.)

Abstract: The proper functioning of neural circuits that integrate sensory signals is essential for individual adaptation to an ever-changing environment. Many molecules can modulate neuronal activity, including neurotransmitters, receptors, and even amino acids. Here, we ask whether amino acid transporters expressed by neurons can influence neuronal activity. We found that *minidiscs* (*mnd*), which encodes a light chain of a heterodimeric amino acid transporter, is expressed in different cell types of the adult *Drosophila* brain: in mushroom body neurons (MBs) and in glial cells. Using live calcium imaging, we found that MND expressed in α/β MB neurons is essential for sensitivity to the L-amino acids: Leu, Ile, Asp, Glu, Lys, Thr, and Arg. We found that the Target Of Rapamycin (TOR) pathway but not the Glutamate Dehydrogenase (GDH) pathway is involved in the Leucine-dependent response of α/β MB neurons. This study strongly supports the key role of MND in regulating MB activity in response to amino acids.

Keywords: solute carrier; SLC; LAT-1; amino acids; mushroom bodies; *Drosophila*



Citation: Delescluse, J.; Simonnet, M.M.; Ziegler, A.B.; Piffaretti, K.; Alves, G.; Grosjean, Y.; Manière, G. A LAT1-Like Amino Acid Transporter Regulates Neuronal Activity in the *Drosophila* Mushroom Bodies. *Cells* **2024**, *13*, 1340. <https://doi.org/10.3390/cells13161340>

Academic Editor: Guy A. Caldwell

Received: 8 March 2024

Revised: 25 July 2024

Accepted: 26 July 2024

Published: 13 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

For any living organism, such as *Drosophila melanogaster*, an adequate supply of nutrients, especially amino acids (AAs), is essential to ensure a variety of functions including development [1], growth [2], lifespan and survival [3–5], reproduction [6,7], egg production and fecundity [3,4,8], and sleep [9]. While some AAs can be synthesized endogenously from precursors, others, known as essential amino acids (EAAs), such as Leu, Ile, Thr, are supplied by the diet. They also provide energy to fuel cellular metabolism. Some AAs are precursors of hormones, such as tryptophan and tyrosine, which are used to produce melatonin and noradrenaline/adrenaline, respectively [10,11]. Some AAs are also neurotransmitter precursors, such as tryptophan, which is required for serotonin production; tyrosine is required for L-dopa and dopamine production [12–14]. Others, such as glutamate, are used directly as neurotransmitters [15], and glutamate is also the precursor of the neurotransmitter GABA [16].

Mammals and invertebrates, such as *Drosophila*, are able to maintain an appropriate AA balance by selecting diets that contain the EAAs they need and avoiding diets that lack EAAs [17,18]. In *Drosophila* larvae, an unbalanced AA diet is detected by dopaminergic neurons (DANs) in the brain via an intracellular AA sensor: the serine/threonine kinase General Control Nonderepressible 2 (GCN2) which acts upstream of GABA signaling to inhibit it and promotes avoidance of an EAA-deficient diet [18]. In adults, food intake is also promoted by three AAs: Glu, Asp, and Ala [19]. EAAs such as Leu and Ile are required for the release of insulin-like peptides (DILPs) by insulin-producing cells (IPCs) in the brain via a GDH pathway to ensure proper larval metabolism [20,21]. Methionine-supplemented diets reduce survival but have no effect on reproduction [22], whereas reduced methionine

intake extends lifespan and reduces reproduction in low AA status [23,24]. Threonine, another EAA, is a sleep-promoting molecule that links neuronal metabolism to GABAergic control of sleep. Thus, threonine may be the neuronal substrate for sleep homeostasis [9].

In the adult *Drosophila* brain, the mushroom bodies (MBs), an integrative brain center, are a critical structure for appetitive olfactory learning and memory [25–28], and aversive olfactory memory [29,30]. In addition, the integration of metabolic cues by the MBs has a critical impact on the control of learned behaviors [31–33]. The MBs consist of 2000 to 2500 neurons per hemisphere [34], called Kenyon cells [35], which project their axons into two (α and α') vertical lobes and three (β , β' , and γ) medial lobes [34,36]. Kenyon cells receive olfactory inputs from the antennal lobes via projection neurons, process the information, and enable olfactory associative learning [37] and memory [38]. Numerous other stimuli, such as visual, thermosensory, and gustatory inputs [39–44], are delivered to the MBs, placing this structure at the center of signal integration and behaviors. In addition, the MB α/β lobes are associated with lifespan [45], which is directly influenced by the quality and quantity of the diet and EAA intake [45].

AA transporters, particularly members of the Solute Carrier family (SLC), play a fundamental role in AA transport in cells, including neurons [46–48]. SLC transporters are divided into several families, particularly the SLC7A family which is divided into two subfamilies: the Cationic Amino-acid Transporters (CATs) [49], and the L-type Amino-acid Transporters (LATs) [50]. In *Drosophila*, a specific member of the CAT family, named Slimfast, is expressed in larval fat body cells and in adult DANs, allowing the activation of TOR [51,52] and the AA sensor GCN2 [18], respectively. This activation leads to the regulation of growth and food intake [18,51]. While CATs, such as Slimfast, function as monomers, LATs form Heterodimeric Amino-acid Transporters (HATs) [50,53]. These HATs consist of two subunits, a heavy chain (SLC3A2/CD98hc) and a light chain [54], encoded by five putative genes in *Drosophila* (*minidiscs*, *Jhl-21*, *genderblind*, *sobremesa* and *CG1607*) [55–58]. In mammals, SLC3A2/CD98/4F2hc targets the complex to the plasma membrane, and the light chain determines the specificity of the AA transporter [59,60]. In *Drosophila* S2 cells, a light chain called Minidiscs (MND) is required for leucine transport [61].

In this study, we investigate the function of MND in the response to AAs in the adult brain. First, we show that *mnd* is expressed in both glial cells and neurons in the adult *Drosophila* brain. By generating specific Gal4 and LexA reporter transgenes, we identified two distinct regulatory regions in the *mnd* gene that control expression either in the mushroom body neurons (α/β and γ lobe neurons of the MBs) or in cortex glia. We used the MB-specific *mnd* driver to study the neuronal activity in response to different AAs in ex vivo functional brain imaging and revealed that MB neurons respond to a wide range of AAs. Here, we show that *mnd* knockdown in α/β MB lobes results in impaired responses to several AAs, including Leu, Ile, Arg, Asp, Glu, Lys, and Thr. Finally, we found that Leucine, an EAA, activates the MBs through the TOR pathway rather than a GDH signaling pathway. Our data establish that MBs are an important brain center for internal AA sensing that depends on the presence of MND, and this highlights how amino acid transporters, such as SLC family transporters, can influence neuronal activity, which may provide new clues to better understand the regulation of neuronal activity.

2. Materials and Methods

2.1. *Drosophila* Strains

All *Drosophila melanogaster* strains were maintained on standard cornmeal/yeast/agar medium, at 25 °C, on a 12 h:12 h light–dark cycle, with 50–60% relative humidity. The fly strains used in this study were as follows: *w¹¹¹⁸*, *mnd²⁴⁻¹-Gal4*, *mnd²⁵⁻¹-Gal4*, and *mnd²⁴⁻¹-LexA* (in this study), *UAS-mCD8::GFP* (stock #32186, stock #32193, Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC)), *elav-Gal4* (stock #8760, BDSC), *repo-Gal4* (stock #7415, BDSC), *c739-Gal4* (stock #7362, BDSC), *c305a-Gal4* (stock #30829, BDSC), *H24-Gal4* (stock #51632, BDSC), *OK107-Gal4* (stock #854, BDSC), *UASftrSTOPftrmCD8::GFP* (stock #30125, BDSC), *LexAop2-FLP* (stock #55819, BDSC), *UAS-GCaMP6s* (stock #42746, BDSC), *UAS-*

mnd^{dsRNAkk} (stock #110217, Vienna Drosophila Stock Research (VDRC)), *UAS-GDH^{dsRNAkk}* (stock # 109499, VDRC), *UAS-TOR^{TED}* (stock #7013, BDSC), and *UAS-TOR^{dsRNA}* (stock #34639, BDSC).

2.2. Transgenic Flies Generated

The *mnd²⁴⁻¹* regulatory sequence (1346 pb) and the *mnd²⁵⁻¹* regulatory sequence (2581 pb) were amplified by PCR from genomic DNA (*w¹¹¹⁸* strain) with the primers 5'-GGTACCGGTGAGTGCTCCAGTGGTAAA-3' (forward) and 5'-GGTACCTACCCATTCGC ACTGATAACC-3' (reverse) for *mnd²⁴⁻¹* and 5'-GGGTAACGGTCTCCCTCTATC-3' (forward) and 5'-CGTTTGAGTCCACATGGTTTTA-3' (reverse), and were cloned into the pGEM[®]-T Easy vector (Promega, France) for sequencing (Eurofins mwg operon, Germany). The DNA fragments were inserted into the *pattB-Gal4-Rev* [62], or *pattB-LexA-Rev* [63], according to the manufacturer's instructions, to generate *pattB-mnd²⁴⁻¹-Gal4*, *pattB-mnd²⁵⁻¹-Gal4*, and *pattB-mnd²⁴⁻¹-LexA* constructs. The constructs were integrated into the *Drosophila* genome by targeted injection into embryos (Genetic Services INC., Bucharest, Romania). The *pattB-mnd²⁴⁻¹-Gal4*, *pattB-mnd²⁵⁻¹-Gal4*, and the *pattB-mnd²⁴⁻¹-LexA* were integrated at the attP2 site (3rd chromosome) by Φ C31 integrase. Molecular details are available upon request.

2.3. gDNA Extraction

Adult flies were frozen and ground in a buffer (0.1 M EDTA pH 8; 0.1 M Tris-HCl pH 9; SDS 1%), incubated for 30 min at 70 °C, and then kept on ice for 30 min after the addition of 28 μ L potassium acetate solution 8 M. After centrifugation at 14,000 \times g for 10 min at 4 °C, isopropanol was added to precipitate nucleic acids. After 10 min at -80 °C and centrifugation at 14,000 \times g for 5 min at 4 °C, gDNA was washed twice with 70% ethanol and dissolved in Tris EDTA pH8.

2.4. RNA Extraction and RT-PCR

RNAs was extracted from the heads or bodies of 3-day-old *w¹¹¹⁸* flies using the TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and treated with RNasefree DNase I (1 U/mL, Thermo scientific, MA, USA) to eliminate contamination from genomic DNA. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR reactions were performed using a thermocycler (Bio-Rad). Amplification of cDNA was performed with 5'-TGGGTAACGGTCTCCCTCT-3' (forward) and 5'-TTTCGGTACGGATCCTTGAG-3' (reverse) before *mnd-RC*- and *mnd-RD*-specific PCR experiments. PCR primers were designed for different exons of the *mnd* coding region (see Figure 1a): *mnd-common*: 5'-GGACAATCCCTCATCGTTTG-3' (forward), 5'-CCTGATTTGGGTATCATCGTG-3' (reverse); *mnd-RA*: 5'-GTGCGTTCATCCGATATTC-3' (forward), 5'-TCCACGTGGTTCTATCATGTTC-3' (reverse); *mnd-RC*: 5'-TGGGTAACGGTCTCCCTCT-3' (forward), 5'-AGCGTGGAGCTTCCAATACA-3' (reverse); *mnd-RD*: 5'-TTCTCCCTCTATCGGAACCA-3' (forward), and 5'-GGAGGAACCTCGAACACCT-3' (reverse). PCR products were visualized by electrophoresis on 3% agarose gel. The 100 pb DNA ladder (Stock #03B-0713, Euromedex, Souffelweyersheim, France) was used.

2.5. qRT-PCR

RNA was extracted from 20 heads/genotypes and cDNA was synthesized from RNA by RT-PCR as described above. A standard protocol was used for real-time PCR with FastSYBR[™] Green Master Mix (#4385612, Applied Biosystem, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR primers for *mnd*: 5'-GGACAATCCCTCATCGTTTG-3' (forward), 5'-CCTGATTTGGGTATCATCGTG-3' (reverse); for housekeeping gene *rp49*: 5'-AGGCCCAAGATCGTGAAGAA-3' (forward), and 5'-TCGATACCCTTGGGCTTG-3' (reverse).

2.6. Immunohistology

The primary antibodies used were rabbit anti-MND (1:250; [20]) mouse anti-GFP (1:200, A-11120, Invitrogen), rabbit anti-GFP (1:500, A-6455, Invitrogen), and mouse anti-nc82 (1:10, DSHB). The secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (A-11029, Invitrogen), goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (A-11008, Invitrogen), goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 (A-11005, Invitrogen), anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (A-11037, Invitrogen), and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 (A-32733, Invitrogen) at 1:400 dilution.

2.7. Whole-Mount Immunostaining

Adult brains were dissected in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 45 min at room temperature (RT), and washed for 6×10 min in PBS + 0.3% Triton X-100 (PBS-T) and 1×10 min in PBS + 1% Triton X-100 to permeabilize membranes. Tissues were blocked for 1 h at RT in PBS-T containing 10% normal goat serum (NGS; Sigma #G9023). Appropriate primary antibodies were diluted in PBS-T + 5% NGS and incubated with the tissues for 1 day at 4 °C. After washing 6×10 min in PBS-T, samples were labeled with the appropriate secondary antibody at 1:400 in PBS-T containing 5% NGS for 3 h at RT. They were washed for 6×10 min in PBS and mounted in VECTASHIELD® mounting medium (H-1000, Vector Laboratories, Peterborough, UK). Fluorescence was observed with a Leica TCS SP8 confocal microscope.

2.8. Cross-Sectioning of Adult Brains

For sectioning, the proboscis, wings, and legs were removed from adult *Drosophila* bodies and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS pH 7.2 for 3 h at 4 °C. The fixative was then replaced with 25% sucrose in *Drosophila* Ringer's solution (46 mM NaCl, 182 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.2) and incubated overnight at 4 °C. The heads were excised, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), frozen in liquid nitrogen, and sectioned at 14 µm using a cryostat (Leica CM 3050). Sections were washed 2×10 min with TBS + 2.5% Triton (TBS-T) and blocked with 5% NGS for 30 min at RT. Primary antibodies were diluted in a blocking solution and incubated with the samples for 1 day at 4 °C. Sections were washed 2×10 min with TBS-T and incubated with the appropriate secondary antibodies diluted in a blocking solution and incubated with the samples overnight at 4 °C. Sections were washed 2×10 min at RT and mounted in VECTASHIELD® Hardest™ mounting medium. Fluorescence was observed with a Leica TCS SP8 confocal microscope.

2.9. Fluorescence Quantification

Immunohistochemical analysis of the MND protein level within the Kenyon cells of control brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *UAS-mCD8::GFP*) and *mnd* downregulated brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *UAS-mCD8::GFP*) was performed. Confocal images were obtained using a 63× objective using a 1 µm step size, and the same laser power and scanning settings were used for all samples, using a Leica TCS SP8 confocal microscope. Mean MND fluorescence intensity in the Kenyon cells was quantified from confocal z-stack images using FIJI software (ImageJ 1.47 k). The signal from an adjacent region to the Kenyon cells served as an autofluorescence background and was subtracted from the mean MND fluorescence in these neurons. To compare the two genotypes, MND values of control brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *UAS-mCD8::GFP*) were used as a reference (immunofluorescence = 1).

2.10. Calcium Imaging

For ex vivo live calcium imaging experiments, 3-day-old adults were immobilized on ice and the brains were carefully and rapidly removed from the capsule head in Ringer's saline (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 36 mM saccharose, 5 mM HEPES, pH 7.3) and placed on a silicone plate in a 150 µL drop of Ringer's saline. To prevent any movement during the imaging, the brains were fixed to the silicone support with insect pins in the optic lobes. GCaMP6s fluorescence was recorded using a Leica DM6000B microscope under

a 25× water objective. GCaMP6s was excited using a Lumencor light engine supplied with diodes at 485 ± 25 nm. The emitted light was collected through a 505–530 nm bandpass filter. Leica MM AF 2.2.0 was used for data collection and acquisition. Images were acquired at 500 ms per frame at 256 × 256 resolution using an Orca-Flash 4.0 camera. A minimum of 480 images were acquired for each experiment: 100 before and 380 after the AA application. The first ten frames before the AA application were used to establish the baseline F_0 . Regions adjacent to the region of interest were used to determine the autofluorescence background level. Changes in fluorescence from initial fluorescence ($\Delta F/F_0$) were calculated as the peak fluorescence after $t = 100$ frames minus F_0 versus F_0 , [64]. AA solutions are extemporaneously prepared with an appropriate concentration in Ringer's saline. All L-AAs used in this study were purchased from Sigma–Aldrich.

2.11. Statistical Analysis

Prism 9 software (Graphpad, v9.0, Boston, MA, USA) was used for statistical analyses. Shapiro–Wilk and D'Agostino–Pearson tests were used to assess normality for all individual experiments. The two-tailed unpaired Student's t-test was used for comparison between two groups with normally distributed data, and the Mann–Whitney test was used for data that did not pass the normality test. For comparisons between more than two groups with normally distributed data, one-way ANOVA was used, and the Kruskal–Wallis test was used for data that did not pass the normality test.

3. Results

3.1. *mnd* Is Expressed in the Adult *Drosophila* Brain

We first examined the expression pattern of *mnd* in adult *Drosophila*. Three *mnd* transcripts were predicted. All should derive through alternative splicing of the 5'UTR, generate *mnd-RA*, *mnd-RC*, and *mnd-RD*, which all encode the same protein [55], see Figure 1a. According to the Flybase prediction (FB2024_03, released 25 June 2024), *mnd* may be expressed in different tissues including the adult brain. To test whether these splice forms may be present in different tissues, we first attempted to detect these three *mnd* transcripts by RT-PCR in adult heads and bodies. We designed specific primers for each cDNA of *mnd* transcripts, represented by colored arrows in Figure 1a. After separating the RT-PCR fragments by agarose gel electrophoresis, we found that *mnd-RA* (111 pb) and *mnd-RC* (183 pb) are expressed in the heads and the bodies, while *mnd-RD* (114 pb) is not (Figure 1b), indicating that *mnd-RD* may be very weakly expressed or does not exist as predicted. The amplified fragment for each mRNA has been sequenced and confirmed the expression of the three different transcripts.

Next, we also investigated MND expression using MND antibodies [20], and we showed that MND is broadly expressed in the brain (Figure S1a) and that the antibodies are specific to MND (Figure S1c,d). To identify the type of cells expressing MND, we used GFP-expression driven by a neuronal-specific driver (*elav-Gal4*) or a glia-specific driver (*repo-Gal4*), the two major cell types in the brain. MND was detected in both neurons and glial cells (Figure 1c).

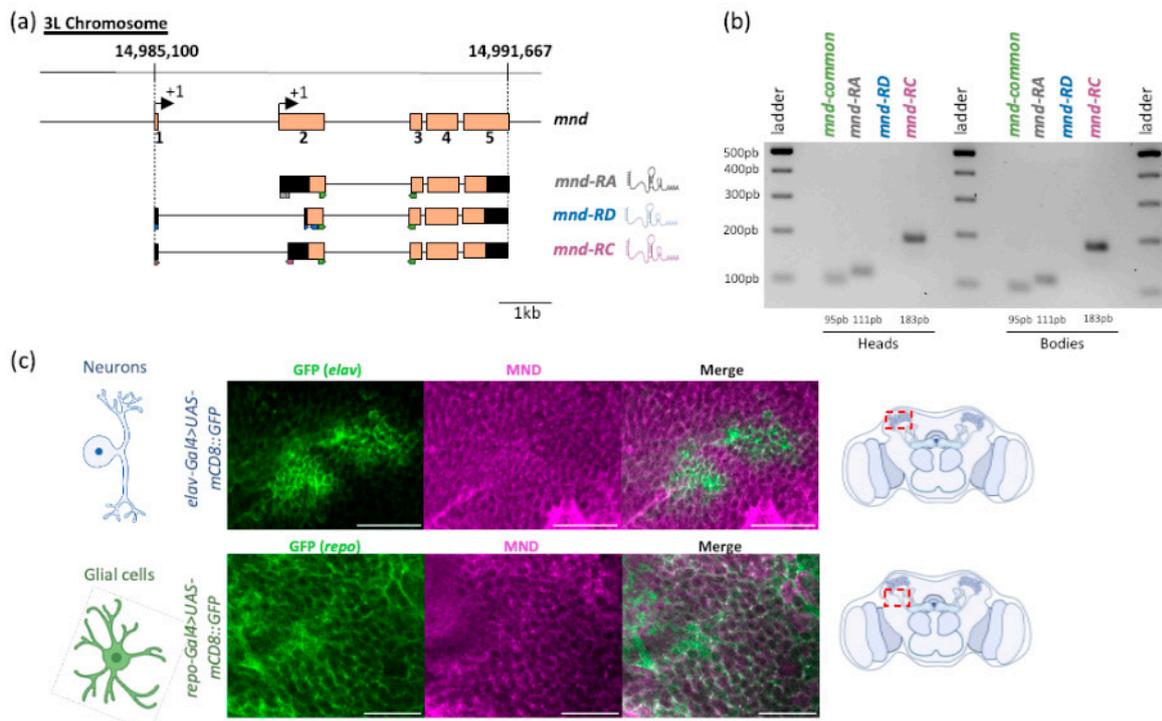


Figure 1. *mnd* is expressed in the adult *Drosophila* brain. (a) Schematic representation of the structure of the *mnd* gene, located on the left arm of the third chromosome (14,985,100–14,991,667 bp). Exons from 1 to 5 are represented by orange boxes and introns by black lines. Three mRNA isoforms were predicted by the ORF analysis from expasy.org: *mnd-RD* (in blue), *mnd-RC* (in purple), and *mnd-RA* (in gray). The 5' and 3' untranslated regions are indicated by black boxes. The arrows under the transcripts indicate the primers used for the RT-PCR analysis: green for the common region of all three alternative *mnd* mRNAs; gray for *mnd-RA*; purple for *mnd-RC*; and blue for *mnd-RD*. Scale bar, 1 kb. (b) *mnd* expression analyzed by RT-PCR using RNAs extracted from *w¹¹¹⁸* adult heads and bodies. PCR products were analyzed by electrophoresis on agarose gel. *mnd-RC* (183 pb) and *mnd-RA* (111 pb) are both present in the adult heads and bodies, whereas *mnd-RD* (114 pb) was not detected in heads or bodies. Primers used for RT-PCR are indicated in (a) with colored arrows: green for the common portion of the three alternative *mnd* mRNAs; gray for *mnd-RA*; purple for *mnd-RC*; and blue for *mnd-RD*. (c) Representative images of double immunostaining with anti-MND (magenta) and anti-GFP (green) on *elav-Gal4 > UAS-mCD8::GFP* brain (neuronal marker) or on *repo-Gal4 > UAS-mCD8::GFP* brain (glial cell marker). Red boxes illustrate the area of the MB calyx (upper image) and the cortex glia (lower image) in the brain where the images were recorded. A total of 12 brains for each condition were examined. MND is present in both neurons and glial cells in the adult brain. White indicates the overlap of the two markers on merged images. Scale bar, 50 μ m.

3.2. The Regulatory Promoter Sequences of *Mnd* Specifically Drives Expression either in Neurons or in Glial Cells

We then attempted to identify *mnd* regulatory sequences capable of driving expression in the nervous system by generating reporter transgenic lines. By bioinformatic analysis, we found two potential regulatory sequences illustrated by the blue box for the region called *mnd*^{24–1} and the green box for the *mnd*^{25–1} region in Figure 2a.

We generated a *Gal4* driver transgene, *mnd*^{25–1}-*Gal4*, containing the regulatory sequence of *mnd* corresponding to the 5'UTR region of the second *mnd* exon (Figure 2a). This transgene drives expression in the adult brain, particularly in glial cells (Figure 2b).

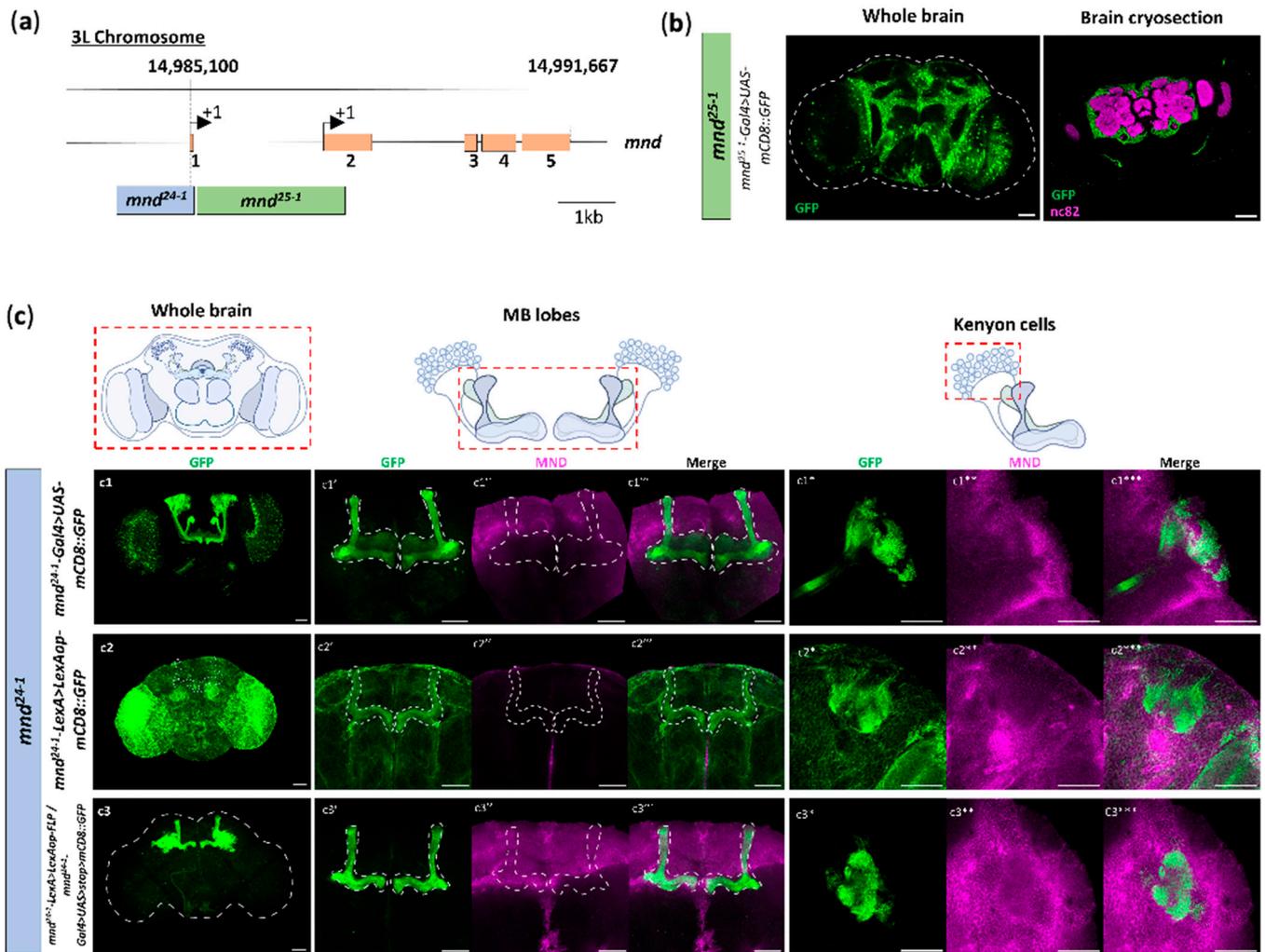


Figure 2. *mnd* regulatory sequences lead to different expression patterns of MND. *mnd* regulatory sequences lead to different MND expression patterns, and *mnd²⁴⁻¹* tools mimic a part of *mnd* expression in the MBs. (a) Schematic representation of the structure of the *mnd* gene. Exons from 1 to 5 are represented by orange boxes and introns by black lines. The upstream regulatory sequences of the *mnd* gene are represented by the blue and the green box and are designed as *mnd²⁴⁻¹* and *mnd²⁵⁻¹*, respectively, to generate transgenic driver lines. *mnd²⁴⁻¹* is located on the first exon of *mnd* with the first initial site of transcription, and *mnd²⁵⁻¹* is located on the second exon of *mnd* including the second initial site of transcription. Scale bar, 1 kb. (b) *mnd²⁵⁻¹-Gal4* induces mCD8::GFP expression in the cortex glia. Representative image of mCD8::GFP expression driven by *mnd²⁵⁻¹-Gal4* (*mnd²⁵⁻¹-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*) in the whole brain magnified by anti-GFP immunostaining, and in brain cryosection labeled by anti-GFP and anti-nc82 to visualize neuropiles. Eight brains were examined. (c) Collection of representative Z-projections and images of mCD8::GFP driven by *mnd²⁴⁻¹* tools and MND labeling. (c1) *mnd²⁴⁻¹-Gal4* induces mCD8::GFP expression in the mushroom body lobes. Representative Z-projections of mCD8::GFP expression driven by *mnd²⁴⁻¹-Gal4* (*mnd²⁴⁻¹-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*) in the whole brain, and magnified by anti-GFP immunostaining (c1). Representative Z-projections of double immunostaining in MB lobes: anti-GFP (c1'), anti-MND (c1''), and merge (c1'''). Representative images of mCD8::GFP and MND showing the colocalization in Kenyon cells: anti-GFP (c1*), anti-MND (c1**), and merge (c1***). A total of 34 brains were examined. (c2) *mnd²⁴⁻¹-LexA* induces mCD8::GFP expression in the brain. Representative Z-projection of mCD8::GFP expression

driven by *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (*mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *LexAop-mCD8::GFP*) in the whole brain, and magnified by anti-GFP immunostaining (c2), in MB lobes anti-GFP (c2'), anti-MND (c2''), and merge (c2'''). Representative images of *mCD8::GFP* and MND showing the colocalization in Kenyon cells: anti-GFP (c2*), anti-MND (c2**), and merge (c2***). A total of 25 brains were examined. (c3) Representative Z-projections of *mCD8::GFP* expression resulting from the genetic intersection between *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* drivers (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *UAS* > *stop* > *mCD8::GFP/mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *FLP*), and magnified by anti-GFP immunostaining (c3). Both the *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* drivers are expressed in the MB lobes: anti-GFP (c3'), anti-MND (c3''), and merge (c3'''). Representative images showing colocalization of anti-GFP and anti-MND in Kenyon cells anti-GFP (c3*), anti-MND (c3**), and merge (c3***). A total of 13 brains were examined. For all images, the scale bar is 50 μ m.

We then found that the *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* transgene containing the regulatory sequences of the 5' region of the first *mnd* exon (Figure 2a) drives expression in the brain, particularly in the neurons of the MBs (Figure 2(c1)). Specifically, we observed that *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* driver expression in the MBs appeared to be restricted to certain lobes. We performed immunostaining on *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *UAS-mCD8::GFP* brains to examine the presence of MND (Figure 2(c1''),c1**)). We observed that MND and GFP co-localized in the cell body of the Kenyon cells (Kcs) (Figure 2(c1*,c1**,c1***)) and found weak MND expression in the MB calyx but not in MB lobes (Figure 2(c1',c1'',c1''')). This supports that the neuronal expression of MND is under the control of the specific *mnd*²⁴⁻¹ regulatory sequence.

The *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* driver, which contains the same regulatory sequence, results in a slightly more widespread GFP expression throughout the brain, particularly in the MB neurons and the optic lobes (Figure 2(c2)). MND immunostaining on *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *LexAop-mCD8::GFP* brains revealed that MND and GFP co-localized in the cell bodies of the Kenyon cells (Kcs) (Figure 2(c1',c1'',c1''')), and we found weak MND expression in the MB calyx but not in MB lobes (Figure 2(c2',c2'',c2''')), such as *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* driver.

These tools allowed us to perform intersectional genetic strategies using the flip-pase/FRT system to observe cells simultaneously positive for *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA*. In the brains of *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4/mnd*²⁴⁻¹-*LexA*, *UAS* > *stop* > *mCD8::GFP*; *LexAop-FLP* flies, we detected GFP and MND expression in MB neurons (Figure 2(c3)), confirming that *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* drivers can mimic part of MND expression in the brain. MND presence was confirmed by MND labeling and co-localization with GFP signal in KCs (Figure 2(c3',c3'',c3''')), but not in MB lobes (Figure 2(c3',c3'',c3''')), consistent with what we observed with *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* individually. Altogether, these results demonstrate that *mnd* expression in mushroom body neurons is dependent on the *mnd*²⁴⁻¹ regulatory sequence.

The MBs are constituted by about 2000 and 2500 Kenyon cells per hemisphere, which send their axons in different directions forming three different lobes, the α/β , α'/β' , and γ lobes, in the anterior part of the brain [34,44]. Each MB lobe processes specific sensory inputs and thus drives particular behavioral outcomes [65]. To identify the lobes in which *mnd*²⁴⁻¹ is expressed, we used an intersectional genetic strategy combining *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *LexAop-FLP*, and different *MB-lobe-specific-Gal4* > *UAS* > *stop* > *mCD8::GFP*, which allowed us to identify common cells expressing *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* and each *MB-lobe-specific-Gal4* drivers.

The GFP expression could be seen in brains when *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (Figure 3e) and the α/β lobe specific driver (*c739-Gal4*) (Figure 3(a2)) were used, indicating that the *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* drives expression in the α/β lobes (Figure 3(a2e)), and MND immunostaining co-localized with GFP, confirming the presence of MND inside these neurons on *c739-Gal4* > *UAS-mCD8::GFP* brains (Figure 3(a1,a1',a1'')). By contrast, combining *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (Figure 3e) and the α'/β' lobe specific driver (*c305-Gal4*) (Figure 3(b2)) did not result in GFP expression, suggesting that *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* driver does not activate expression in the α'/β' lobes (Figure 3(b2e)). Surprisingly, MND labeling co-localized with GFP on *c305-Gal4* > *UAS-mCD8::GFP* brains (Figure 3(b1,b1',b1'')), suggesting that MND is expressed in α'/β' lobes, but is not driven by the *mnd*²⁴⁻¹ regulatory sequence. At least at the intersection between *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* and the γ lobe specific driver (*H24-Gal4*) (Figure 3(c2)), we observed

GFP expression in *mnd*²⁴⁻¹ and *H24* expressing neurons, indicating that the *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* driver activates expression in the γ lobes (Figure 3(c2e)), and MND immunostaining co-localized with GFP, confirming the presence of MND inside these neurons in *H24-Gal4* > *UAS-mCD8::GFP* brains (Figure 3(c1,c1',c1'')). We also performed genetic intersectional experiments between *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* and *OK107-Gal4* (Figure 3(d2)), which allowed us to confirm that the *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* driver is expressed in α/β and γ lobes and not in α'/β' lobes of the MBs (Figure 3(d2)). The presence of MND was confirmed by co-localization of MND and GFP (Figure 3(d1,d1',d1'')). Thus, we have shown that the *mnd*²⁴⁻¹ promoter sequence specifically drives expression in the α/β lobes and in the γ lobes.

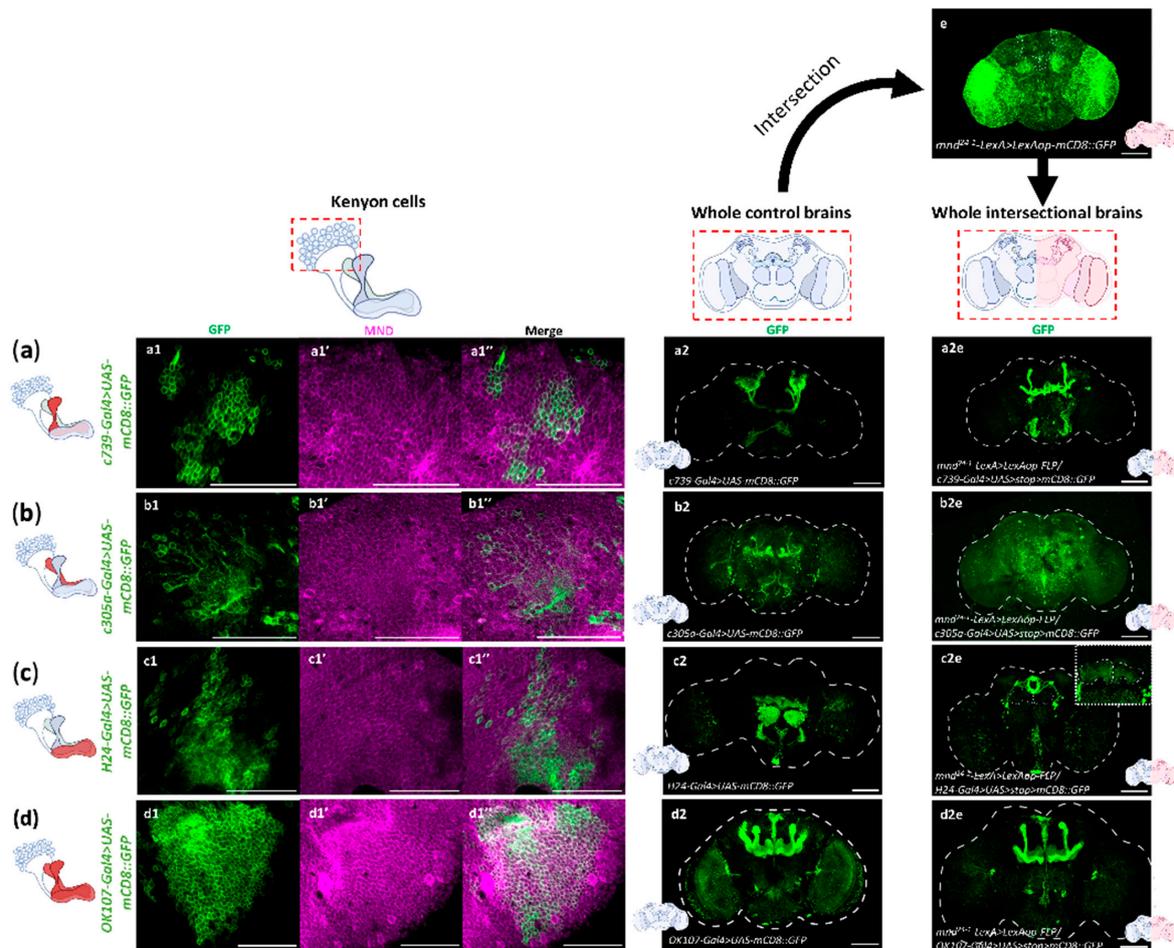


Figure 3. *mnd* is expressed in Kenyon cells forming α/β and γ lobes. Genetic intersectional strategy between *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* line, which mimics *mnd* expression in the brain, and *MB-lobe-specific-Gal4* driver lines to reveal common cells. (a) Genetic intersectional GFP expression between *c739-Gal4*, an α/β lobe specific driver, and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA*, and magnified by anti-GFP immunostaining. Representative images of anti-GFP (a1) and anti-MND (a1') in Kenyon cells (*c739-Gal4* > *UAS-mCD8::GFP*), merge (a1''). Representative z-projection of *mCD8::GFP* expression driven by *c739-Gal4* (*c739-Gal4* > *UAS-mCD8::GFP*) in whole brain (a2). Seven brains were examined. Representative z-projection of *mCD8::GFP* expression driven by *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (*mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *LexAop-mCD8::GFP*) (e). A total of 25 brains were examined. Representative z-projection of *mCD8::GFP* expression resulting from the intersection of *c739-Gal4* and *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* (*mnd*²⁴⁻¹-*LexA* > *LexAop-FLP/c739-Gal4* > *UAS-stop* > *mCD8::GFP*) (a2e). A total of 11 brains were examined. *mnd*²⁴⁻¹-*LexA* is expressed in the α/β lobes of the MBs. (b) Genetic intersectional GFP expression between *c305a-Gal4*, a specific driver of α'/β'

lobes and *mnd²⁴⁻¹-LexA*, and magnified by anti-GFP immunostaining. Representative images of anti-GFP (**b1**) and anti-MND (**b1'**) in Kenyon cells (*c305a-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*), merge (**b1''**). Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *c305a-Gal4* (*c305a-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*) in whole brain (**b2**). A total of 16 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-mCD8::GFP*) (**e**). A total of 25 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression resulting from the intersection of *c305a-Gal4* and *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-FLP/c305a-Gal4 > UAS > stop > mCD8::GFP*) (**b2e**). A total of 11 brains were examined. *mnd²⁴⁻¹-LexA* is not expressed in the α' / β' lobes of the MBs. (**c**) Genetic intersectional GFP expression between *H24-Gal4*, a specific driver of γ lobes and *mnd²⁴⁻¹-LexA*, and magnified by anti-GFP immunostaining. Representative images of anti-GFP (**c1**) and anti-MND (**c1'**) in Kenyon cells (*H24-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*), merge (**c1''**). Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *H24-Gal4* (*H24-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*) in whole brain (**c2**). A total of 17 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-mCD8::GFP*) (**e**). A total of 25 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression resulting from the intersection of *H24-Gal4* and *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-FLP/H24-Gal4 > UAS > stop > mCD8::GFP*) (**c2e**). A total of 12 brains were examined. *mnd²⁴⁻¹-LexA* is weakly expressed in the γ lobes. (**d**) Genetic intersectional GFP expression between *OK107-Gal4*, a specific driver of all MB lobes, and *mnd²⁴⁻¹-LexA*, and magnified by anti-GFP immunostaining. Representative images of anti-GFP (**d1**) and anti-MND (**d1'**) in Kenyon cells (*OK107-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*), merge (**d1''**). Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *OK107-Gal4* (*OK107-Gal4 > UAS-mCD8::GFP*) in whole brain (**d2**). A total of 10 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression driven by *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-mCD8::GFP*) (**e**). A total of 25 brains were examined. Representative z-projection of mCD8::GFP expression resulting from the intersection of *OK107-Gal4* and *mnd²⁴⁻¹-LexA* (*mnd²⁴⁻¹-LexA > LexAop-FLP/OK107-Gal4 > UAS > stop > mCD8::GFP*) (**d2e**). A total of 11 brains were examined. *mnd²⁴⁻¹-LexA* is expressed in the α/β and γ lobes of the MBs. For all images the scale bar is 50 μm .

3.3. MND Is Required for AA Dependent Activity of Kenyon Cells

MND is present in MB neurons, but its precise function as an AA transporter has not yet been demonstrated in vivo. MND has been described as a Leu transporter in S2 cell cultures [61] and as a Leucine sensor in larval IPCs where it enables DILP release [20]. To test whether and how MND impacts neuronal activity within the MB, we expressed the calcium sensor *GCaMP6s* in *mnd²⁴⁻¹-Gal4* expressing neurons (*mnd²⁴⁻¹-Gal4 > GCaMP6s*) and studied their activation using calcium imaging on ex vivo brains. In the brain, glutamate released by neurons or glial cells activates MB neurons, which express different glutamate receptors [66–70]. Therefore, we decided to test the activity of the *mnd²⁴⁻¹*-positive MB neurons in response to different concentrations of Glutamate in 3-, 6-, or 9-day-old flies. We tested Glu concentrations from 0.2 mM to 20 mM, which was previously used to activate neurons in *Drosophila* [71–75]). The highest response was observed in 3-day-old flies when 20 mM Glu was applied to the brains (Figure S2). Consequently, we tested the response to the remaining 19 natural L-AAs using the same conditions.

Our results show that the *mnd²⁴⁻¹-Gal4 > GCaMP6s* expressing MB neurons that form the α/β lobes can respond to all L-AAs except Serine and Tryptophan (Figure 4a,c). We noticed that three amino acids, namely, Glutamate, Proline, and Threonine, elicited the highest responses among all L-AA tested (Figure 4c).

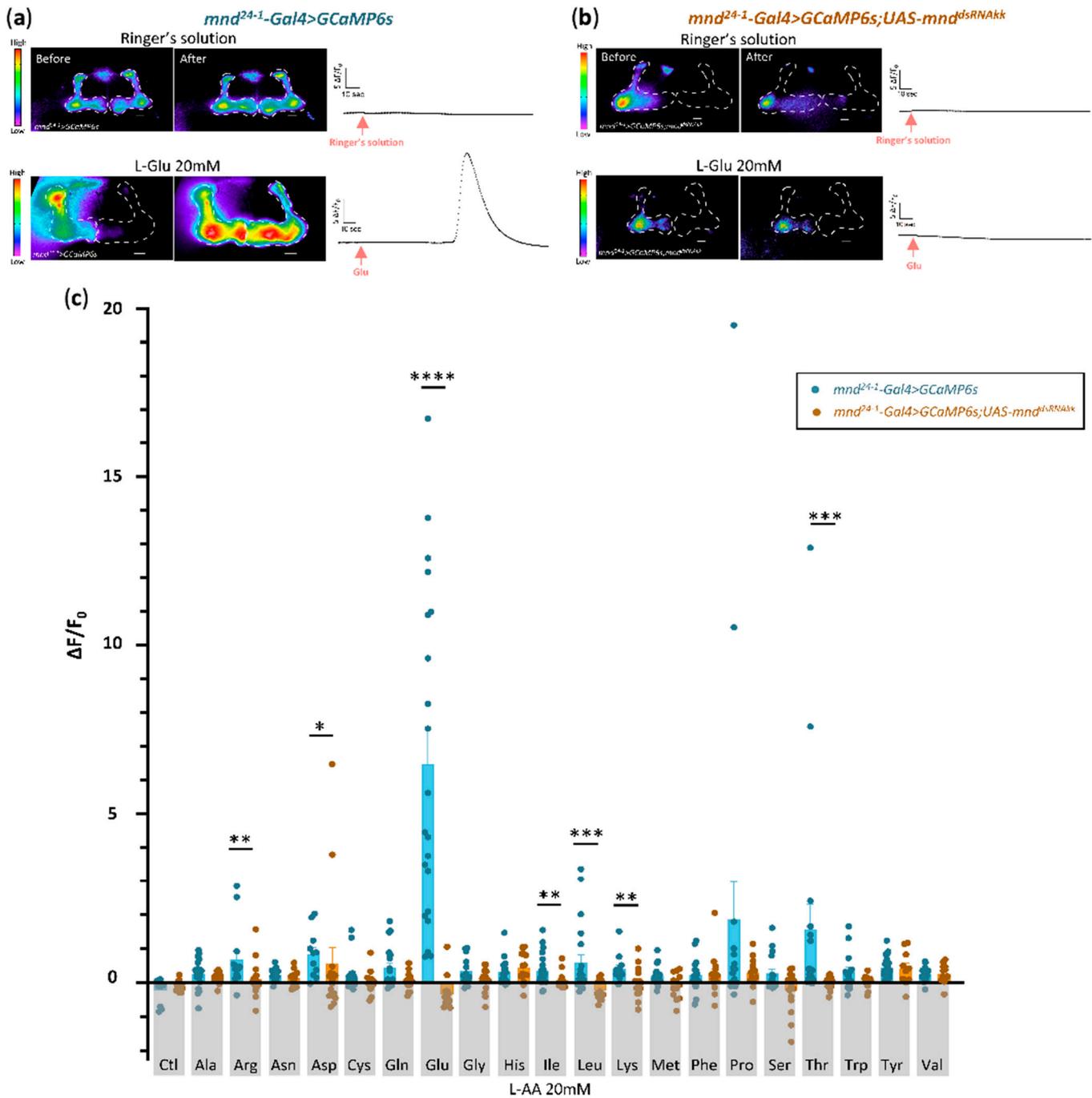


Figure 4. MND is required for AA sensing in the MBs. Real-time calcium imaging of ex vivo brains expressing a calcium sensor in the α/β lobes of the MBs in control brains (*mnd²⁴⁻¹-Gal4 > GCaMP6s*) or in *mnd* downregulated brains (*mnd²⁴⁻¹-Gal4 > GCaMP6s;UAS-mnd^{dsRNAkk}*) of 3-day-old flies exposed to each L-AA at a concentration of 20 mM. The different intensities of basal GCaMP6s levels in the vicinity of the two lobes are sometimes difficult to convert to similar rainbow colors, and thus in some brains only one lobe appears in false color. **(a)** Representative images, in false colors, showing the fluorescence level before (basal activity) and after the addition of either control Ringer's solution or Glu (20 mM) in control brains (*mnd²⁴⁻¹-Gal4 > GCaMP6s*). Scale bar, 50 μ m. Line plots of fluorescence changes ($\Delta F/F_0$) in α/β lobe neurons stimulated with Ringer's solution or 20 mM of Glu

for one representative brain. Stimulus application is indicated by a red arrow. (b) Representative images, in false colors, showing the fluorescence level before (basal activity) and after the addition of either control Ringer's solution or Glu (20 mM) in *mnd* downregulated brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*; *UAS-mnd*^{dsRNAkk}). Scale bar, 50 μ m. Line plots of fluorescence changes ($\Delta F/F_0$) in α/β lobe neurons stimulated with Ringer's solution or 20 mM of Glu for one representative brain. Stimulus application is indicated by a red arrow. (c) Averaged fluorescence intensity of positive or negative peaks \pm SEM for control brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*, blue histograms) and for *mnd* downregulated brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*; *UAS-mnd*^{dsRNAkk}, orange histograms) in response to either Ringer's solution (Ctl) or a specific L-AA at 20 mM. All individual data are shown by dots ($n = 10$ to 23). For each L-AA, data obtained from *mnd* downregulated brains (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*; *UAS-mnd*^{dsRNAkk}) were compared to the corresponding control (*mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*) using a Mann-Whitney test. The absence of * for a given AA indicates that the data are not statistically different between the two conditions. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

To elucidate the role of MND in MB activity in response to L-amino acids, we examined the activity of *mnd*²⁴⁻¹-*Gal4* > *GCaMP6s*; *mnd*^{dsRNAKK} brains in which *mnd* is knocked-down only in the *mnd*²⁴⁻¹ positive neurons expressing the calcium sensor *GCaMP6s* (Figures 4b,c and S1b). These results are consistent with our previous experiments showing that MND is involved in the transport of Leu, Ile, and not Val in larval IPCs to enable the release of DILPs [20]. In addition, we show that MND is also involved in the sensing of other L-AAs such as Arg, Asp, Glu, Lys, and Thr in the α/β MB neurons (Figure 4c).

3.4. The TOR Signaling Pathway Mediates the Stimulation of the MBs by Leucine

Leucine, an EAA supplied through dietary food intake, is capable of regulating cell function through either the Target Of Rapamycin (TOR) pathway or the Glutamate Dehydrogenase (GDH) pathway [20,76–79]. In a previous study, we demonstrated that Leu triggers the release of DILPs via the GDH pathway in an MND-dependent manner [20]. Since Leu and Ile, two amino acids, activate the MBs that express *mnd* (Figure 4c), we examined the downstream GDH and TOR signaling pathways (Figure 5a). In adult brains, inactivation of GDH did not reduce the activity of the α/β MB neurons in response to L-Leu (Figure 5b). We next investigated whether MB activation by L-Leu could be mediated by the TOR pathway. Overexpression of a dominant negative form of TOR (TOR^{TED}) in *mnd*²⁴⁻¹-positive neurons impaired the L-Leu-dependent stimulation of the MBs (Figure 5b). Similarly, the *mnd*²⁴⁻¹-positive MB neurons are not activated by L-Leu when TOR expression is silenced by RNAi (Figure 5b). These results show that the stimulation of the α/β MB neurons by Leucine depends on MND and the TOR pathway, but not on the GDH pathway.

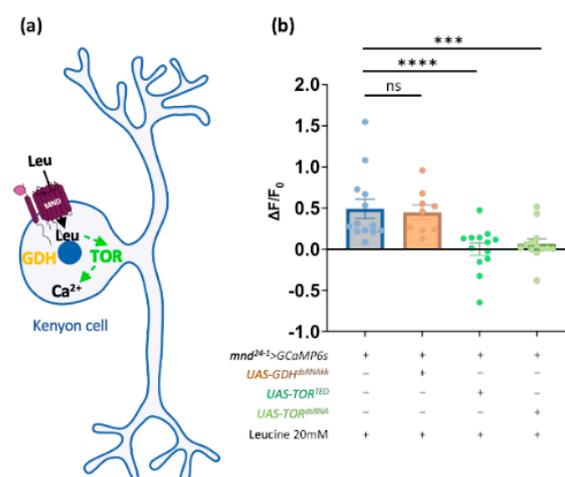


Figure 5. Leucine-mediated activity is TOR-dependent in the MBs. (a) Schematic representation of a Kenyon cell and the putative pathways downstream of leucine activity. (b) Real-time calcium imaging

of ex vivo brains expressing a calcium sensor in the α/β lobes of the MBs in control brains ($mnd^{24-1}-Gal4 > GCaMP6s$), in GDH-downregulated brains ($mnd^{24-1}-Gal4 > GCaMP6s; UAS-GDH^{dsRNAkk}$), or in TOR downregulated brains ($mnd^{24-1}-Gal4 > GCaMP6s; UAS-TOR^{TED}$ or $mnd^{24-1}-Gal4 > GCaMP6s; UAS-TOR^{dsRNA}$) of 3-day-old flies exposed to L-Leu at a concentration of 20 mM. Each histogram represents the averaged fluorescence intensity of peaks \pm SEM in α/β lobes of the MBs. All individual data are shown by dots ($n = 9$ to 13). All data were compared with the control ($mnd^{24-1}-Gal4 > GCaMP6s$) by a Mann–Whitney test. ns: not significant, ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

4. Discussion

4.1. *mnd* Is Expressed in Different Cell Types in the Adult Brain

In this study, we show that MND, a LAT1-like AA transporter, is present in the adult *Drosophila* brain. Our data reveal the expression of two *mnd* mRNAs, *mnd-RA* and *mnd-RC*, within the *Drosophila* head, while the third predicted *mnd-RD* transcript was undetectable, indicating either its absence or very low expression levels. Furthermore, we have shown that MND is expressed by both neurons and glia, suggesting that *mnd* may be regulated by distinct regulatory sequences in the *mnd* promoter. By examining the promoter regulatory region of *mnd*, we show that two specific regulatory sequences drive expression in two different regions of the adult brain. $mnd^{25-1}-Gal4$ drives MND expression specifically in cortex glial cells. These findings are consistent with previous studies showing that *mnd* is expressed in glial cells [75,80]. We observe that $mnd^{24-1}-Gal4$ is expressed in MB neurons. Our intersectional genetic strategies reveal that the mnd^{24-1} regulatory sequence drives expression in the α/β and γ lobes but not in the α'/β' lobes of the MBs. Immunostaining of MND showed that MND is located in the neurons of the α/β and γ lobes but also in the α'/β' lobes of the MBs, suggesting the mnd^{24-1} regulatory sequence only controls the expression of *mnd* in a subset of neurons of the MBs and implying that another neuronal regulatory sequence of *mnd* exists.

4.2. AAs Stimulate Neuronal Activity in the MBs

The EAAs Leu, Ile, and Thr must be supplied by the diet and they can act as nutrient signals to regulate the state of nutritional homeostasis [9,20,81]. Interestingly, the MBs are an integrated center for hunger control of food-seeking behaviour receiving input signals of hunger and satiety [33]. DANs regulate MB activity and control innate olfactory behaviour. These DANs are under the control of satiety signals such as insulin-like peptides and AstA or hunger signals such as NPF, sNPF, and serotonin [33]. Here, we show that the α/β lobes of the MBs are activated by EAAs such as Leu, Ile, and Thr. Thus, EAAs, nutrients arriving from the gut, can directly or indirectly affect neuronal functions driven by the MBs. We also show that Glu, an excitatory neurotransmitter, significantly enhances the activity of the MBs. The increase in calcium activity in the MBs induced by Glu may be due to a direct or indirect action of Glu.

4.3. Disruption of *mnd* Impairs Response of the MBs to AAs

Initially, *mnd* was described to be involved in the non-autonomous development of imaginal discs in the larvae [55]. We did not observe any changes in the shape and length of the α/β lobes when *mnd* was downregulated in the MBs, suggesting that MND is not involved in the development of the MBs [82]. In our experiments, the downregulation of *mnd* in the MBs does not reduce neuronal activity in response to amino acids such as Ala, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Tyr, and Val (Figure 4c). Disruption of MND function in the α/β lobes of the MBs reduces neuronal activity in the response to certain AAs, such as Leu and Ile. In mammals, Leucine regulates the activity of hypothalamic POMC neurons to control food intake [83] through mTOR signaling [84]. In *Drosophila*, MBs integrate hunger and food signals to monitor food-seeking behaviour [33]. We show that MBs are sensitive to Leu suggesting that MBs integrate protein satiety signals to adjust their activity. Previously, we have shown that MND is required for the sensing of Leu in the larval brain IPCs, resulting in an increase of neuronal activity and, DILPs release through a GDH pathway [20,21].

Surprisingly, in adult MBs, Leucine regulates neuronal activity through the TOR pathway but not the GDH pathway (Figure 6). Interestingly, MND-expressing glial cells show no calcium activity in response to Leucine (Figure S3), suggesting a different function of MND in this specific cell type or the cellular pathway is calcium-independent.

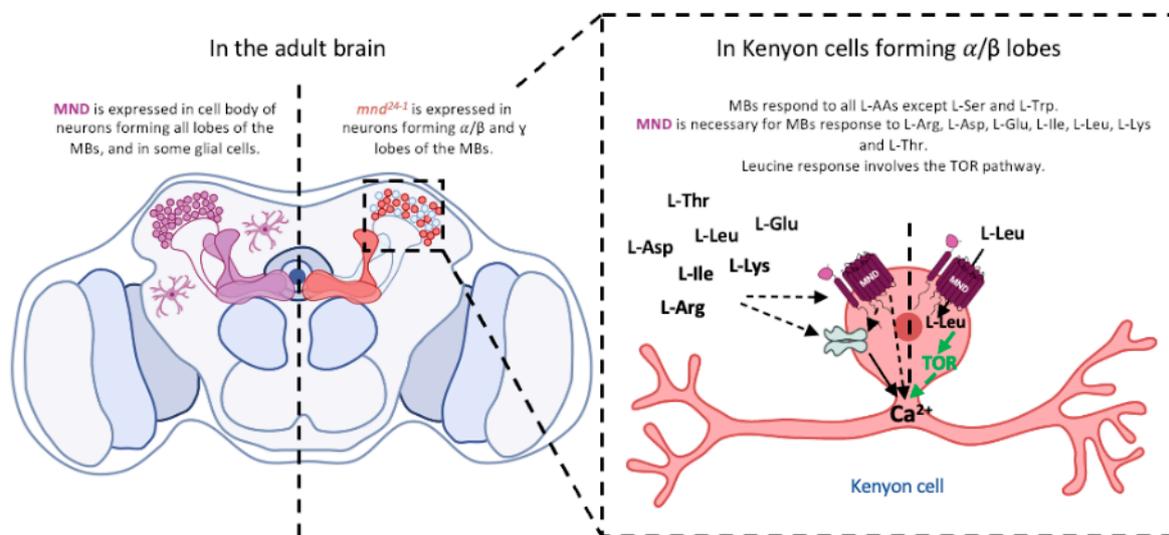


Figure 6. A model for AA sensing through MND in MBs.

Leucine affects calcium activity in the α/β lobes of MBs through MND, a LAT1-like amino acid transporter, via the TOR pathway. The activity of L-AAs such as Arg, Asp, Glu, Leu, Ile, Lys, and Thr on the MBs is MND-dependent, and MND could potentially affect AA receptors or transporters or the downstream pathways.

In summary, our work shows that extracellular AAs can induce calcium activity in the MB α/β lobes and that, for certain AAs, this activity is MND-dependent. MND, a LAT1-like transporter, may have a direct or indirect effect on AA receptors or transporters in the MBs. In the brain, Leucine is sensed by glial cells to promote a preference for Leucine-containing food [85]. Furthermore, ensheathing glial cells surrounding the MBs release Glutamate onto MBs required for associative memories [70]. Since MND is also expressed in glial cells, it could be interesting to investigate its potential role in AAs transport in these cells. Further investigation of the cellular and molecular mechanisms will provide new insights into the role of MND in MBs and glial cells for proper regulation of brain activity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells13161340/s1>, Figure S1: MND antibody specificity and *mnd* RNAi efficiency; Figure S2: Dose and age-dependent MBs response to L-Glu; Figure S3: Leucine's lack of effect on glial calcium activity.

Author Contributions: Conceptualization, J.D., M.M.S., Y.G. and G.M.; methodology, J.D., M.M.S., K.P., G.A., Y.G. and G.M.; formal analysis, J.D., M.M.S., K.P., Y.G. and G.M.; investigation, J.D., M.M.S., K.P., A.B.Z. and G.M.; writing—original draft preparation, J.D. and G.M.; writing—review and editing, J.D., G.A., A.B.Z., Y.G. and G.M.; supervision, Y.G. and G.M.; project administration, Y.G. and G.M.; funding acquisition, Y.G. and G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the CNRS, the “Université de Bourgogne”, the FEDER (European Funding for Regional Economical Development), the European Council (ERC starting grant, GliSFCo-311403), and the ANR Pepneuron (ANR-21-CE16-0027) to Y.G., and by the Conseil Régional Bourgogne Franche-Comté (PARI, NeuroSens, ALIMENN grants) to Y.G. and G.M.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Acknowledgments: We thank Serge Loquin and Amandine Chlémaire for their technical help. We thank the DImaCELL platform for the confocal microscope access. Schematic representations were created in BioRender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Manière, G.; Alves, G.; Berthelot-Grosjean, M.; Grosjean, Y. Growth Regulation by Amino Acid Transporters in *Drosophila* Larvae. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 4289–4297. [[CrossRef](#)]
- Texada, M.J.; Koyama, T.; Rewitz, K. Regulation of Body Size and Growth Control. *Genetics* **2020**, *216*, 269–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Min, K.-J.; Tatar, M. Restriction of Amino Acids Extends Lifespan in *Drosophila Melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127*, 643–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grandison, R.C.; Piper, M.D.W.; Partridge, L. Amino Acid Imbalance Explains Extension of Lifespan by Dietary Restriction in *Drosophila*. *Nature* **2009**, *462*, 1061–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tatar, M. The Plate Half-Full: Status of Research on the Mechanisms of Dietary Restriction in *Drosophila Melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 363–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Good, T.P.; Tatar, M. Age-Specific Mortality and Reproduction Respond to Adult Dietary Restriction in *Drosophila Melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **2001**, *47*, 1467–1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ma, C.; Mirth, C.K.; Hall, M.D.; Piper, M.D.W. Amino Acid Quality Modifies the Quantitative Availability of Protein for Reproduction in *Drosophila Melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **2022**, *139*, 104050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Piper, M.D.W.; Soultoukis, G.A.; Blanc, E.; Mesaros, A.; Herbert, S.L.; Juricic, P.; He, X.; Atanassov, I.; Salmonowicz, H.; Yang, M.; et al. Matching Dietary Amino Acid Balance to the In Silico-Translated Exome Optimizes Growth and Reproduction without Cost to Lifespan. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 610–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ki, Y.; Lim, C. Sleep-Promoting Effects of Threonine Link Amino Acid Metabolism in *Drosophila* Neuron to GABAergic Control of Sleep Drive. *eLife* **2019**, *8*, e40593. [[CrossRef](#)]
- Finocchiaro, L.; Callebert, J.; Launay, J.M.; Jallon, J.M. Melatonin Biosynthesis in *Drosophila*: Its Nature and Its Effects. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 382–387. [[CrossRef](#)]
- Fernstrom, J.D.; Fernstrom, M.H. Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J. Nutr.* **2007**, *137* (Suppl. S1), 1539S–1547S, discussion 1548S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Richard, D.M.; Dawes, M.A.; Mathias, C.W.; Acheson, A.; Hill-Kapturczak, N.; Dougherty, D.M. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int. J. Tryptophan Res.* **2009**, *2*, 45–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fernstrom, J.D. Aromatic Amino Acids and Monoamine Synthesis in the Central Nervous System: Influence of the Diet. *J. Nutr. Biochem.* **1990**, *1*, 508–517. [[CrossRef](#)]
- Vömel, M.; Wegener, C. Neuroarchitecture of Aminergic Systems in the Larval Ventral Ganglion of *Drosophila Melanogaster*. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1848. [[CrossRef](#)]
- Hayashi, T. Effects of Sodium Glutamate on the Nervous System. *Keio J. Med.* **1954**, *3*, 183–192. [[CrossRef](#)]
- Fernstrom, J.D. Dietary Amino Acids and Brain Function. *J. Am. Diet. Assoc.* **1994**, *94*, 71–77. [[CrossRef](#)]
- Münch, D.; Ezra-Nevo, G.; Francisco, A.P.; Tastekin, I.; Ribeiro, C. Nutrient Homeostasis—Translating Internal States to Behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2020**, *60*, 67–75. [[CrossRef](#)]
- Björdal, M.; Arquier, N.; Kniazeff, J.; Pin, J.P.; Léopold, P. Sensing of Amino Acids in a Dopaminergic Circuitry Promotes Rejection of an Incomplete Diet in *Drosophila*. *Cell* **2014**, *156*, 510–521. [[CrossRef](#)]
- Yang, Z.; Huang, R.; Fu, X.; Wang, G.; Qi, W.; Mao, D.; Shi, Z.; Shen, W.L.; Wang, L. A Post-Ingestive Amino Acid Sensor Promotes Food Consumption in *Drosophila*. *Cell Res.* **2018**, *28*, 1013–1025. [[CrossRef](#)]
- Manière, G.; Ziegler, A.B.; Geillon, F.; Featherstone, D.E.; Grosjean, Y. Direct Sensing of Nutrients via a LAT1-like Transporter in *Drosophila* Insulin-Producing Cells. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 137–148. [[CrossRef](#)]
- Ziegler, A.B.; Manière, G.; Grosjean, Y. JhI-21 Plays a Role in *Drosophila* Insulin-like Peptide Release from Larval IPCs via Leucine Transport. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zajitschek, F.; Zajitschek, S.R.K.; Friberg, U.; Maklakov, A.A. Interactive Effects of Sex, Social Environment, Dietary Restriction, and Methionine on Survival and Reproduction in Fruit Flies. *Age* **2013**, *35*, 1193–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, B.C.; Kaya, A.; Ma, S.; Kim, G.; Gerashchenko, M.V.; Yim, S.H.; Hu, Z.; Harshman, L.G.; Gladyshev, V.N. Methionine Restriction Extends Lifespan of *Drosophila Melanogaster* under Conditions of Low Amino-Acid Status. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kosakamoto, H.; Obata, F.; Kuraishi, J.; Aikawa, H.; Okada, R.; Johnstone, J.N.; Onuma, T.; Piper, M.D.W.; Miura, M. Early-Adult Methionine Restriction Reduces Methionine Sulfoxide and Extends Lifespan in *Drosophila*. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 7832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Wang, J.W.; Wong, A.M.; Flores, J.; Vosshall, L.B.; Axel, R. Two-Photon Calcium Imaging Reveals an Odor-Evoked Map of Activity in the Fly Brain. *Cell* **2003**, *112*, 271–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schwaerzel, M.; Monastirioti, M.; Scholz, H.; Friggi-Grelin, F.; Birman, S.; Heisenberg, M. Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 10495–10502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Keene, A.C.; Krashes, M.J.; Leung, B.; Bernard, J.A.; Waddell, S. *Drosophila* Dorsal Paired Medial Neurons Provide a General Mechanism for Memory Consolidation. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 1524–1530. [[CrossRef](#)]
28. Krashes, M.J.; Waddell, S. Rapid Consolidation to a Radish and Protein Synthesis-Dependent Long-Term Memory after Single-Session Appetitive Olfactory Conditioning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3103–3113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lewis, L.P.C.; Siju, K.P.; Aso, Y.; Friedrich, A.B.; Bulteel, A.J.B.; Rubin, G.M.; Grunwald Kadow, I.C. A Higher Brain Circuit for Immediate Integration of Conflicting Sensory Information in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 2203–2214. [[CrossRef](#)]
30. Oswald, D.; Felsenberg, J.; Talbot, C.B.; Das, G.; Perisse, E.; Huetteroth, W.; Waddell, S. Activity of Defined Mushroom Body Output Neurons Underlies Learned Olfactory Behavior in *Drosophila*. *Neuron* **2015**, *86*, 417–427. [[CrossRef](#)]
31. Krashes, M.J.; DasGupta, S.; Vreede, A.; White, B.; Armstrong, J.D.; Waddell, S. A Neural Circuit Mechanism Integrating Motivational State with Memory Expression in *Drosophila*. *Cell* **2009**, *139*, 416–427. [[CrossRef](#)]
32. Perisse, E.; Oswald, D.; Barnstedt, O.; Talbot, C.B.; Huetteroth, W.; Waddell, S. Aversive Learning and Appetitive Motivation Toggle Feed-Forward Inhibition in the *Drosophila* Mushroom Body. *Neuron* **2016**, *90*, 1086–1099. [[CrossRef](#)]
33. Tsao, C.-H.; Chen, C.-C.; Lin, C.-H.; Yang, H.-Y.; Lin, S. *Drosophila* Mushroom Bodies Integrate Hunger and Satiety Signals to Control Innate Food-Seeking Behavior. *eLife* **2018**, *7*, e35264. [[CrossRef](#)]
34. Aso, Y.; Hattori, D.; Yu, Y.; Johnston, R.M.; Iyer, N.A.; Ngo, T.-T.; Dionne, H.; Abbott, L.; Axel, R.; Tanimoto, H.; et al. The Neuronal Architecture of the Mushroom Body Provides a Logic for Associative Learning. *eLife* **2014**, *3*, e04577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kenyon, F.C. The Brain of the Bee. A Preliminary Contribution to the Morphology of the Nervous System of the Arthropoda. *J. Comp. Neurol.* **1896**, *6*, 133–210. [[CrossRef](#)]
36. Crittenden, J.R.; Skoulakis, E.M.; Han, K.A.; Kalderon, D.; Davis, R.L. Tripartite Mushroom Body Architecture Revealed by Antigenic Markers. *Learn. Mem.* **1998**, *5*, 38–51. [[CrossRef](#)]
37. de Belle, J.S.; Heisenberg, M. Associative Odor Learning in *Drosophila* Abolished by Chemical Ablation of Mushroom Bodies. *Science* **1994**, *263*, 692–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Heisenberg, M. Mushroom Body Memoir: From Maps to Models. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 266–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Vogt, K.; Schnaitmann, C.; Dylla, K.V.; Knapek, S.; Aso, Y.; Rubin, G.M.; Tanimoto, H. Shared Mushroom Body Circuits Underlie Visual and Olfactory Memories in *Drosophila*. *eLife* **2014**, *3*, e02395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Li, J.; Mahoney, B.D.; Jacob, M.S.; Caron, S.J.C. Visual Input into the *Drosophila* *Melanogaster* Mushroom Body. *Cell Rep.* **2020**, *32*, 108138. [[CrossRef](#)]
41. Marin, E.C.; Büld, L.; Theiss, M.; Sarkissian, T.; Roberts, R.J.V.; Turnbull, R.; Tamimi, I.F.M.; Pleijzier, M.W.; Laursen, W.J.; Drummond, N.; et al. Connectomics Analysis Reveals First-, Second-, and Third-Order Thermosensory and Hygrosensory Neurons in the Adult *Drosophila* Brain. *Curr. Biol.* **2020**, *30*, 3167–3182.e4. [[CrossRef](#)]
42. Masek, P.; Scott, K. Limited Taste Discrimination in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14833–14838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kirkhart, C.; Scott, K. Gustatory Learning and Processing in the *Drosophila* Mushroom Bodies. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 5950–5958. [[CrossRef](#)]
44. Li, F.; Lindsey, J.W.; Marin, E.C.; Otto, N.; Dreher, M.; Dempsey, G.; Stark, I.; Bates, A.S.; Pleijzier, M.W.; Schlegel, P.; et al. The Connectome of the Adult *Drosophila* Mushroom Body Provides Insights into Function. *eLife* **2020**, *9*, e62576. [[CrossRef](#)]
45. Lien, W.; Chen, Y.; Li, Y.; Wu, J.; Huang, K.; Lin, J.; Lin, S.; Hou, C.; Wang, H.; Wu, C.; et al. Lifespan Regulation in α/β Posterior Neurons of the Fly Mushroom Bodies by Rab27. *Aging Cell* **2020**, *19*, e13179. [[CrossRef](#)]
46. Xu, Y.; An, F.; Borycz, J.A.; Borycz, J.; Meinertzhagen, I.A.; Wang, T. Histamine Recycling Is Mediated by CarT, a Carcinine Transporter in *Drosophila* Photoreceptors. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lin, W.-Y.; Williams, C.; Yan, C.; Koledachkina, T.; Luedke, K.; Dalton, J.; Bloomsburg, S.; Morrison, N.; Duncan, K.E.; Kim, C.C.; et al. The SLC36 Transporter Pathetic Is Required for Extreme Dendrite Growth in *Drosophila* Sensory Neurons. *Genes. Dev.* **2015**, *29*, 1120–1135. [[CrossRef](#)]
48. Aboudhief, S.; Alves, G.; Parrot, S.; Amri, M.; Simonnet, M.M.; Grosjean, Y.; Manière, G.; Seugnet, L. LAT1-like Transporters Regulate Dopaminergic Transmission and Sleep in *Drosophila*. *Sleep* **2018**, *41*, zsy137. [[CrossRef](#)]
49. Closs, E.I.; Boissel, J.-P.; Habermeier, A.; Rotmann, A. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *J. Membr. Biol.* **2006**, *213*, 67–77. [[CrossRef](#)]
50. Fotiadis, D.; Kanai, Y.; Palacín, M. The SLC3 and SLC7 Families of Amino Acid Transporters. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 139–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Colombani, J.; Raison, S.; Pantalacci, S.; Radimerski, T.; Montagne, J.; Léopold, P. A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell* **2003**, *114*, 739–749. [[CrossRef](#)]
52. Bradley, G.L.; Leivers, S.J. Amino Acids and the Humoral Regulation of Growth: Fat Bodies Use Slimfast. *Cell* **2003**, *114*, 656–658. [[CrossRef](#)]
53. Verrey, F.; Closs, E.I.; Wagner, C.A.; Palacin, M.; Endou, H.; Kanai, Y. CATs and HATs: The SLC7 Family of Amino Acid Transporters. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* **2004**, *447*, 532–542. [[CrossRef](#)]

54. Wagner, C.A.; Lang, F.; Bröer, S. Function and Structure of Heterodimeric Amino Acid Transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *281*, C1077–C1093. [[CrossRef](#)]
55. Martin, J.F.; Hersperger, E.; Simcox, A.; Shearn, A. Minidiscs Encodes a Putative Amino Acid Transporter Subunit Required Non-Autonomously for Imaginal Cell Proliferation. *Mech. Dev.* **2000**, *92*, 155–167. [[CrossRef](#)]
56. Featherstone, D.E. Glial Solute Carrier Transporters in Drosophila and Mice. *Glia* **2011**, *59*, 1351–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Augustin, H.; Grosjean, Y.; Chen, K.; Sheng, Q.; Featherstone, D.E. Nonvesicular Release of Glutamate by Glial XCT Transporters Suppresses Glutamate Receptor Clustering In Vivo. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 111–123. [[CrossRef](#)]
58. Galagovsky, D.; Depetris-Chauvin, A.; Manière, G.; Geillon, F.; Berthelot-Grosjean, M.; Noiro, E.; Alves, G.; Grosjean, Y. Sobremesa L-Type Amino Acid Transporter Expressed in Glia Is Essential for Proper Timing of Development and Brain Growth. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 3156–3166.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Pfei, R. Functional Heterodimeric Amino Acid Transporters Lacking Cysteine Residues Involved in Disulfide Bond. *FEBS Lett.* **1998**, *439*, 157–162.
60. Nakamura, E.; Sato, M.; Yang, H.; Miyagawa, F.; Harasaki, M.; Tomita, K.; Matsuoka, S.; Noma, A.; Iwai, K.; Minato, N. 4F2 (CD98) Heavy Chain Is Associated Covalently with an Amino Acid Transporter and Controls Intracellular Trafficking and Membrane Topology of 4F2 Heterodimer. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3009–3016. [[CrossRef](#)]
61. Reynolds, B.; Roversi, P.; Laynes, R.; Kazi, S.; Boyd, C.A.R.; Goberdhan, D.C.I. Drosophila Expresses a CD98 Transporter with an Evolutionarily Conserved Structure and Amino Acid-Transport Properties. *Biochem. J.* **2009**, *420*, 363–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bischof, J.; Maeda, R.K.; Hediger, M.; Karch, F.; Basler, K. An Optimized Transgenesis System for Drosophila Using Germ-Line-Specific phi31 Integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3312–3317. [[CrossRef](#)]
63. Pfeiffer, B.D.; Ngo, T.-T.B.; Hibbard, K.L.; Murphy, C.; Jenett, A.; Truman, J.W.; Rubin, G.M. Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in Drosophila. *Genetics* **2010**, *186*, 735–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Miyamoto, T.; Slone, J.; Song, X.; Amrein, H. A Fructose Receptor Functions as a Nutrient Sensor in the Drosophila Brain. *Cell* **2012**, *151*, 1113–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. McGuire, S.E.; Deshazer, M.; Davis, R.L. Thirty Years of Olfactory Learning and Memory Research in Drosophila Melanogaster. *Progress. Neurobiol.* **2005**, *76*, 328–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wu, C.-L.; Xia, S.; Fu, T.-F.; Wang, H.; Chen, Y.-H.; Leong, D.; Chiang, A.-S.; Tully, T. Specific Requirement of NMDA Receptors for Long-Term Memory Consolidation in Drosophila Ellipsoid Body. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1578–1586. [[CrossRef](#)]
67. Sinakevitch, I.; Grau, Y.; Strausfeld, N.J.; Birman, S. Dynamics of Glutamatergic Signaling in the Mushroom Body of Young Adult Drosophila. *Neural Dev.* **2010**, *5*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kondo, S.; Takahashi, T.; Yamagata, N.; Imanishi, Y.; Katow, H.; Hiramatsu, S.; Lynn, K.; Abe, A.; Kumaraswamy, A.; Tanimoto, H. Neurochemical Organization of the Drosophila Brain Visualized by Endogenously Tagged Neurotransmitter Receptors. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 284–297.e5. [[CrossRef](#)]
69. Ueno, K.; Suzuki, E.; Naganos, S.; Ofusa, K.; Horiuchi, J.; Saitoe, M. Coincident Postsynaptic Activity Gates Presynaptic Dopamine Release to Induce Plasticity in Drosophila Mushroom Bodies. *eLife* **2017**, *6*, e21076. [[CrossRef](#)]
70. Miyashita, T.; Murakami, K.; Kikuchi, E.; Ofusa, K.; Mikami, K.; Endo, K.; Miyaji, T.; Moriyama, S.; Konno, K.; Muratani, H.; et al. Glia Transmit Negative Valence Information during Aversive Learning in Drosophila. *Science* **2023**, *382*, eadf7429. [[CrossRef](#)]
71. Hamasaka, Y.; Rieger, D.; Parmentier, M.-L.; Grau, Y.; Helfrich-Förster, C.; Nässel, D.R. Glutamate and Its Metabotropic Receptor in Drosophila Clock Neuron Circuits. *J. Comp. Neurol.* **2007**, *505*, 32–45. [[CrossRef](#)]
72. Xia, S.; Miyashita, T.; Fu, T.-F.; Lin, W.-Y.; Wu, C.-L.; Pyzocha, L.; Lin, I.-R.; Saitoe, M.; Tully, T.; Chiang, A.-S. NMDA Receptors Mediate Olfactory Learning and Memory in Drosophila. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 603–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Han, T.H.; Dharkar, P.; Mayer, M.L.; Serpe, M. Functional Reconstitution of Drosophila Melanogaster NMJ Glutamate Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 6182–6187. [[CrossRef](#)]
74. Zhao, X.; Karpac, J. Glutamate Metabolism Directs Energetic Trade-Offs to Shape Host-Pathogen Susceptibility in Drosophila. *Cell Metab.* **2021**, *33*, 2428–2444.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Park, A.; Croset, V.; Otto, N.; Agarwal, D.; Treiber, C.D.; Meschi, E.; Sims, D.; Waddell, S. Gliotransmission of D-Serine Promotes Thirst-Directed Behaviors in Drosophila. *Curr. Biol.* **2022**, *32*, 3952–3970. [[CrossRef](#)]
76. Zhou, X.; Thompson, J.R. Regulation of Glutamate Dehydrogenase by Branched-Chain Amino Acids in Skeletal Muscle from Rats and Chicks. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 787–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lynch, C.J.; Fox, H.L.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S.; Kimball, S.R. Regulation of Amino Acid-Sensitive TOR Signaling by Leucine Analogues in Adipocytes. *J. Cell Biochem.* **2000**, *77*, 234–251. [[CrossRef](#)]
78. Lynch, C.J. Role of Leucine in the Regulation of MTOR by Amino Acids: Revelations from Structure-Activity Studies. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 861S–865S. [[CrossRef](#)]
79. Cheng, Q.; Beltran, V.D.; Chan, S.M.H.; Brown, J.R.; Bevington, A.; Herbert, T.P. System-L Amino Acid Transporters Play a Key Role in Pancreatic β -Cell Signalling and Function. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *56*, 175–187. [[CrossRef](#)]
80. Li, H.; Aboudhiah, S.; Parrot, S.; Scote-Blachon, C.; Benetollo, C.; Lin, J.S.; Seugnet, L. Pallidin function in Drosophila surface glia regulates sleep and is dependent on amino acid availability. *Cell Rep.* **2023**, *42*, 113025. [[CrossRef](#)]
81. Géminard, C.; Rulifson, E.J.; Léopold, P. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in Drosophila. *Cell Metab.* **2009**, *10*, 199–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

82. Zwarts, L.; Vanden Broeck, L.; Cappuyns, E.; Ayroles, J.F.; Magwire, M.M.; Vulsteke, V.; Clements, J.; Mackay, T.F.C.; Callaerts, P. The Genetic Basis of Natural Variation in Mushroom Body Size in *Drosophila Melanogaster*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Heeley, N.; Kirwan, P.; Darwish, T.; Arnaud, M.; Evans, M.L.; Merkle, F.T.; Reimann, F.; Gribble, F.M.; Blouet, C. Rapid Sensing of l-Leucine by Human and Murine Hypothalamic Neurons: Neurochemical and Mechanistic Insights. *Mol. Metab.* **2018**, *10*, 14–27. [[CrossRef](#)]
84. Cota, D.; Proulx, K.; Smith, K.A.B.; Kozma, S.C.; Thomas, G.; Woods, S.C.; Seeley, R.J. Hypothalamic MTOR Signaling Regulates Food Intake. *Science* **2006**, *312*, 927–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gu, X.; Jouandin, P.; Lalgudi, P.V.; Binari, R.; Valenstein, M.L.; Reid, M.A.; Allen, A.E.; Kamitaki, N.; Locasale, J.W.; Perrimon, N.; et al. Sestrin mediates detection of and adaptation to low-leucine diets in *Drosophila*. *Nature* **2022**, *608*, 209–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.