

Acquisition, stockage, restitution et dynamique des phases de mémoire

a- Les lobes antennaires apparaissent comme étant le premier site de d'intégration de l'information

En 2004, Yu et ses collègues (Yu, Ponomarev et al., 2004) ont conditionné des mouches transgéniques exprimant la synapto-pHluorin au niveau des PN pour pouvoir observer les conséquences de l'apprentissage sur l'activité du cerveau. Ils ont placé ces mouches en contention dans un cône de pipette, puis ils ont retiré la cuticule, et placé l'animal vivant, le crâne ouvert, sous un microscope confocal pour pouvoir ainsi observer l'activité de la pHluorin *in vivo* (Ng, Roorda et al., 2002). Ils ont ensuite présenté de manière simultanée ou non l'odeur octanol et les chocs électriques. Puis ils représentent de nouveau l'octanol, et enregistrent les variations d'activité en fonction du protocole utilisé. Ils ont pu ainsi quantifier le relargage synaptique de ces neurones PN au niveau des glomérules des lobes antennaires avant et après conditionnement. Chez des mouches naïves, les odeurs sont représentées par la stimulation de différents groupes de PN qui projettent sur les glomérules. Chez les mouches conditionnées, les odeurs sont également représentées par les mêmes groupes de PN, mais auxquels s'ajoutent d'autres PN. Le conditionnement, qui abouti normalement à un apprentissage, semble ainsi recruter d'autres activités synaptiques de PN qui ne répondent initialement pas au conditionnement (choc+odeur). La représentation de ce CS induit des changements synaptiques qui sont plutôt d'ordre quantitatif que qualitatif. Cette trace mnésique a une très courte durée de vie de 5 à 7min et pourrait représenter la MCT.

Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus il y a plus de 20 ans par Erber et Menzel en 1980 (Erber et al., 1980). Grâce à une sonde froide, ils ont réussi à inactiver certaines régions du cerveau de l'abeille après un conditionnement, induisant un réflexe d'extension du proboscis. Une amnésie partielle est générée si les lobes antennaires sont inactivés dans une fenêtre de 3min après conditionnement.

b- Les corps pédonculés sont le site majeur de la formation de la mémoire olfactive

Il y a une accumulation d'évidences directes qui soutiennent l'idée que les corps pédonculés ont un rôle majeur dans la mémoire olfactive. Depuis les expériences avec l'hydroxy-urée de De Belle et Heisenberg en 1994 (de Belle and Heisenberg 1994), de nombreuses autres équipes ont essayé d'aller plus en détails pour comprendre leur rôle exact dans la formation de la mémoire. Pour déterminer l'importance des neurones des corps pédonculés, Dubnau et ses collaborateurs, ainsi que les équipes de Ron Davis et de Tim Tully, ont utilisé un transgène thermosensible *Shi^{ts}* (McGuire, Le et al., 2003). Celui-ci permet de bloquer au moment désiré, grâce à un passage à 30°C, les transmissions synaptiques des neurones sous le contrôle d'un promoteur. Il est alors possible de bloquer ces neurones, soit pendant l'acquisition, soit pendant le stockage, soit pendant la restitution de l'information.

Lorsque des mouches exprimant ce transgène au niveau des corps pédonculés sont entraînées puis testées à température restrictive, la formation de la mémoire olfactive est bloquée. Par contre si ce blocage intervient seulement durant l'apprentissage, ou durant l'étape de consolidation, et plus au cours de l'étape de restitution (le test), les mouches exprimant le promoteur et le transgène ne présentent pas des scores différents de ceux des contrôles. Par contre, si les neurones de sortie des corps pédonculés sont bloqués au moment du test, une chute significative est observée comme présenté sur la figure 11 (Dubnau, Graby et al., 2001 ; McGuire, Le et al., 2001). La transmission synaptique depuis les CPs est donc nécessaire pour la restitution. De plus comme le blocage des neurones durant le conditionnement ou la consolidation n'affecte pas les scores de mémoire, on peut considérer que ces mêmes neurones de sortie ne sont pas nécessaires durant ces étapes. Il ne semble à priori pas y avoir de boucle retour sur ces neurones. Enfin, pour spécifier quels sont les lobes importants dans l'acquisition de l'information olfactive, le transgène *Shi^{ts}* a été conduit seulement dans les neurones α/β . Les résultats sont identiques à ceux observés lorsque *Shi^{ts}* est exprimé dans tous les neurones des corps pédonculés. A la lumière de ces résultats il semble que l'information soit stockée dans ces lobes.

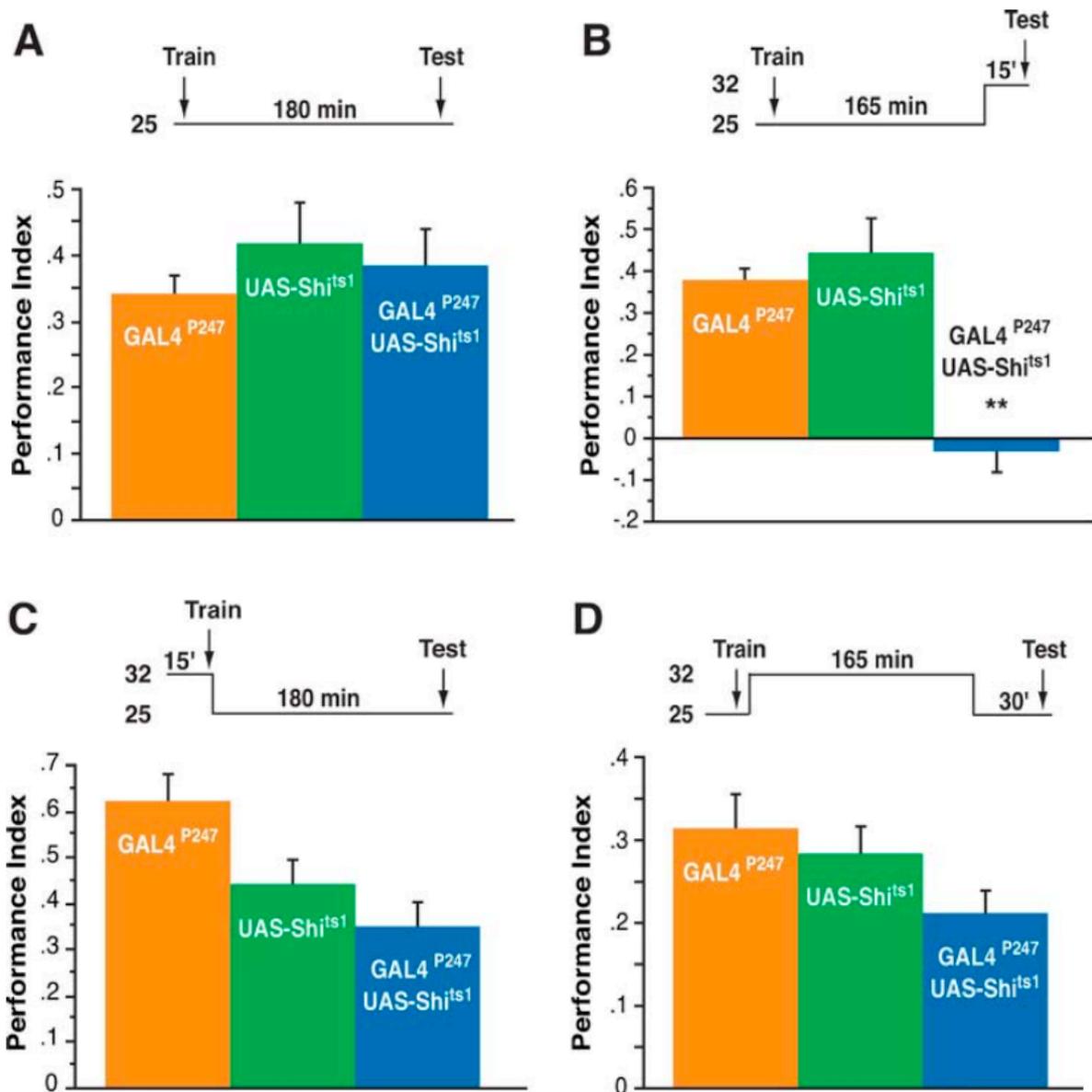


Figure 11 : Effet du blocage synaptique de la sortie des corps pédonculés sur la mémoire olfactive.

Étude de la mémoire à 3h chez des individus portant soit le transposon Gal4 p247 spécifique des MB, soit l'UAS-Shi^{ts}, soit les deux. A : à 25°C aucune différence à température permissive. B : bloquer les sorties des MB au moment du test entraîne une chute significative de la mémoire. C : conditionner uniquement à une température restrictive n'entraîne pas une chute de mémoire significativement différente des contrôles. D : placer les individus entraînés dans des conditions de température permissive, puis les placer à une température restrictive, ne génère pas non plus de chute de mémoire significative. Ainsi la transmission synaptique depuis les corps pédonculés est nécessaire pour la restitution. Adaptés de McGuire 2003 (McGuire, Le et al., 2003).

Enfin, en 2007, une étude menée Scott Waddell a montré l'utilisation séquentielle des différents lobes dans la mémoire (Krashes, M. J., A. C. Keene, et al., 2007). Pour cela il a conduit l'expression du transgène thermosensible *Shi^{ts}* des les différents lobes en utilisant des promoteurs spécifiques de certains lobes. Les résultats sont présentés figure 12.

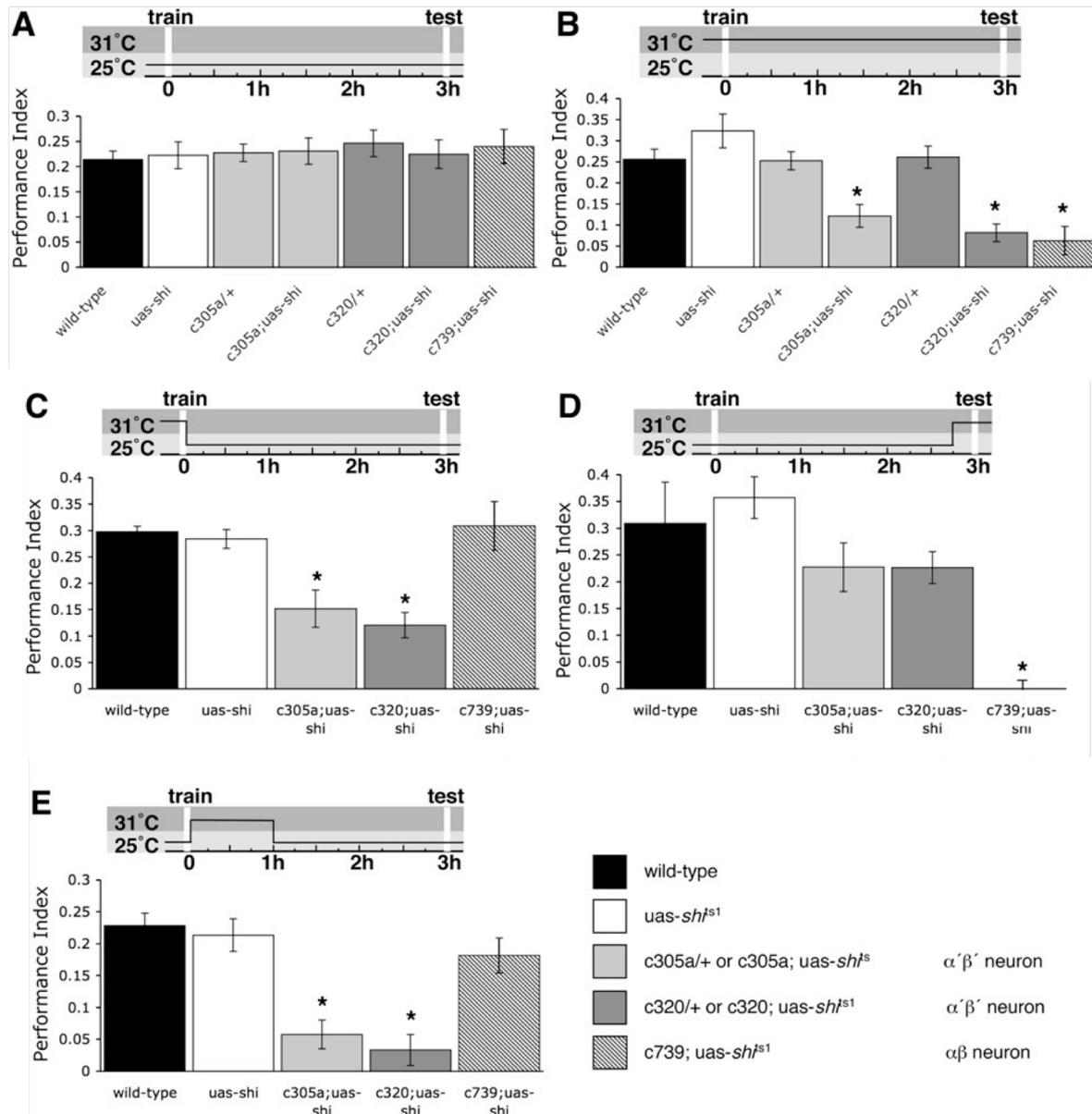


Figure 12 : La sortie des neurones α'/β' est requise pour l'acquisition et la consolidation de la mémoire aversive.

(A) à température permissive toutes les constructions présentent les mêmes capacités de mémoire 3heures après un conditionnement. (B) bloquer les neurones a/b ou a'/b' tout au long de l'expérience abolit les capacités mnésiques. (C) bloquer les neurones a'/b' pendant l'apprentissage abolit la mémoire ce qui n'est pas le cas des neurones a/b. (D) Pour la restitution, par contre les neurones a/b sont nécessaires ce qui n'est pas le cas des neurones a'/b'. (E) Les neurones a'/b' sont également nécessaire lors de la consolidation (Krashes, M. J., A. C. Keene, et al., (2007)).

Grâce à ces expériences, ils ont ainsi démontré que la neurotransmission depuis les lobes α'/β' des neurones des CPs est requise pour l'acquisition et la stabilisation de la mémoire aversive. Néanmoins ces neurones ne sont pas nécessaires pour la restitution mnésique, fonction qui est pour sa part supportée par les lobes α/β . Ces résultats suggèrent ainsi une utilisation dynamique des différents neurones.

Ainsi une première mémoire se formerait dans les lobes antennaires au niveau des neurones de projection, puis serait localisée dans les neurones des corps pédonculés qui guident les modifications du comportement. Néanmoins qu'en est-il de la mémoire à long terme, celle qui perdure plusieurs jours ? En 2001, l'équipe de Thomas Prémat, grâce à l'étude d'un mutant anatomique, a réussi à identifier les lobes responsables du stockage de la mémoire à long terme. Le mutant anatomique *alpha-lobes-absent*, ou *ala*, est un mutant structurel dont le phénotype a une pénétrance variable. Environ 10% des mouches possèdent les lobes des corps pédonculés normaux, 36% sont dépourvus de lobes β/β' , et 5% n'ont pas de lobes α/α' (Pascual and Prémat 2001). Le reste de la population présente des défauts plus asymétriques, ne touchant que l'un ou l'autre des hémisphères, ou bien des combinaisons des phénotypes déjà présentés. Ces lobes manquants ne se sont soit pas développés, soit présentent des défauts de guidage dans une autre partie du cerveau. Malgré cela, cette population hétérogène, prise dans son ensemble, présente des scores de mémoire normaux, aussi bien 3 heures après un seul cycle de conditionnement, que 24 heures après les protocoles massés ou espacés. Néanmoins, après avoir testé un groupe de mouche *ala*, si nous analysons par immunohistochimie la structure des corps pédonculés des mouches ayant fait le bon ou le mauvais choix, on observe des différences significatives entre phénotype. Les mouches n'ayant pas les lobes médians β/β' , ne présentent pas de différence avec les contrôles 24h après un conditionnement espacé, alors que celles n'ayant plus de lobes verticaux α/α' n'ont plus de mémoire à long terme. Leur score de mémoire après un conditionnement massé, ou après un seul cycle et testé 3 heures plus tard est malgré tout normal (figure 13). Cette étude a permis de montrer de manière évidente le rôle des corps pédonculés, et plus précisément des lobes verticaux, dans la formation de la mémoire olfactive à long terme. De plus comme la mémoire à court terme est normale dans ces mutants, il est possible que pour le stockage de cette information, les différents lobes aient des fonctions redondantes.

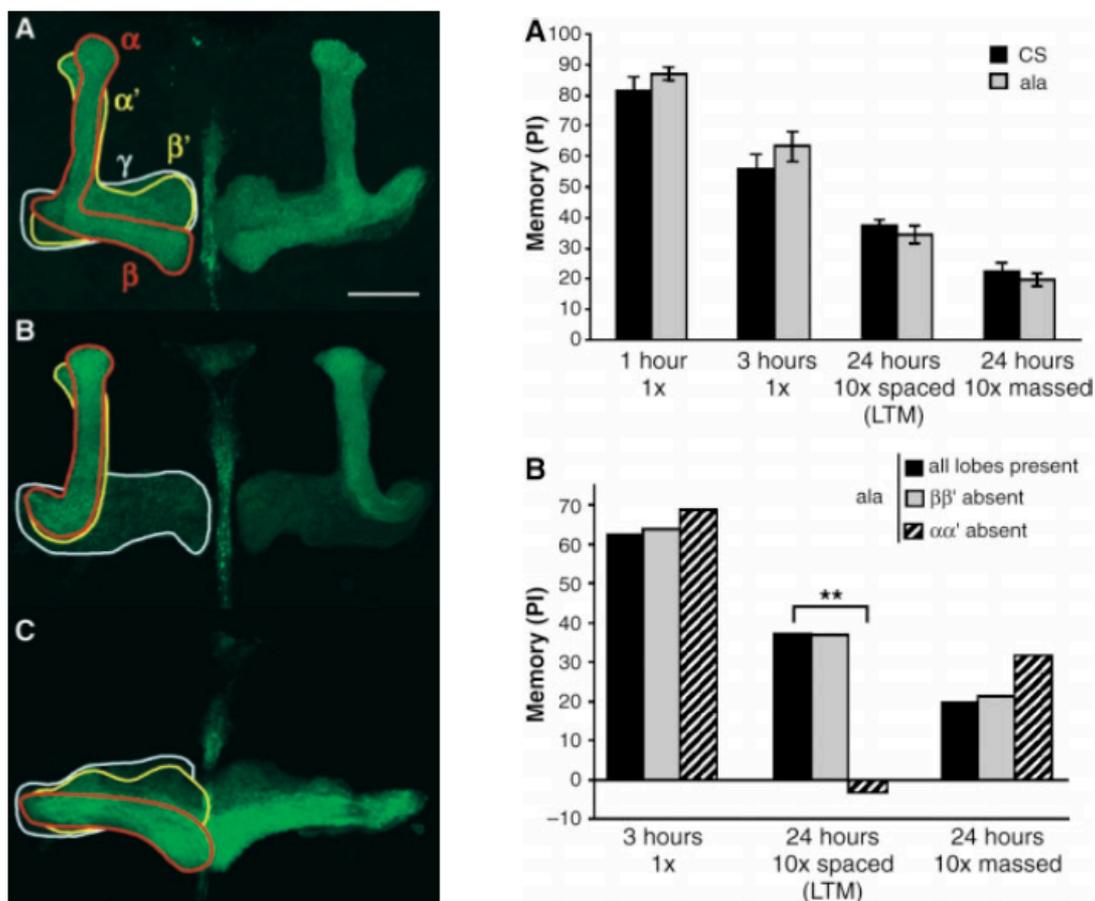


Figure 13 : Les mutants *ala* présentent des défauts spécifiques

La mémoire à long terme est abolie chez les drosophiles n'ayant plus de lobes verticaux. Les mouches *ala* ont une mémoire normale et cela quel que soit le protocole (A) ; néanmoins la sous-population n'ayant plus de lobes α/α' présente une chute significative de mémoire à long terme (B) (Pascual and Preat 2001).

Shi^{ts} s'avère un outil permettant également d'analyser les mémoires consolidées, et qui permet d'effacer les doutes de certains scientifiques issus de cette première étude. En 2004, Guillaume Isabel (Isabel, Pascual et al., 2004) , au sein de notre laboratoire, utilisa différents promoteurs pour conduire l'expression du transgène *Shi^{ts}* dans des régions précises du cerveau. La lignée 247 permet une expression dans tous les lobes, 1471 dans les lobes γ uniquement, et enfin *c739* dans les lobes α/β . Les mouches exprimant *Shi^{ts}* avec le promoteur *c739* présentent des scores de mémoire réduits de moitié par rapport aux différents contrôles dans le protocole gérant de la mémoire à long terme. Bien que celle-ci ne soit pas totalement effacée, cette expérience montre de manière évidente le rôle central de ces lobes dans le

stockage de la mémoire à long terme. De plus, après un seul cycle de conditionnement suivi d'un choc par le froid pour éliminer la mémoire labile, ce qui est mesurée 2h après est de la MRA (figure 14). Là encore les lobes α/β sont impliqués car leur blocage conduit à une chute de mémoire significative.

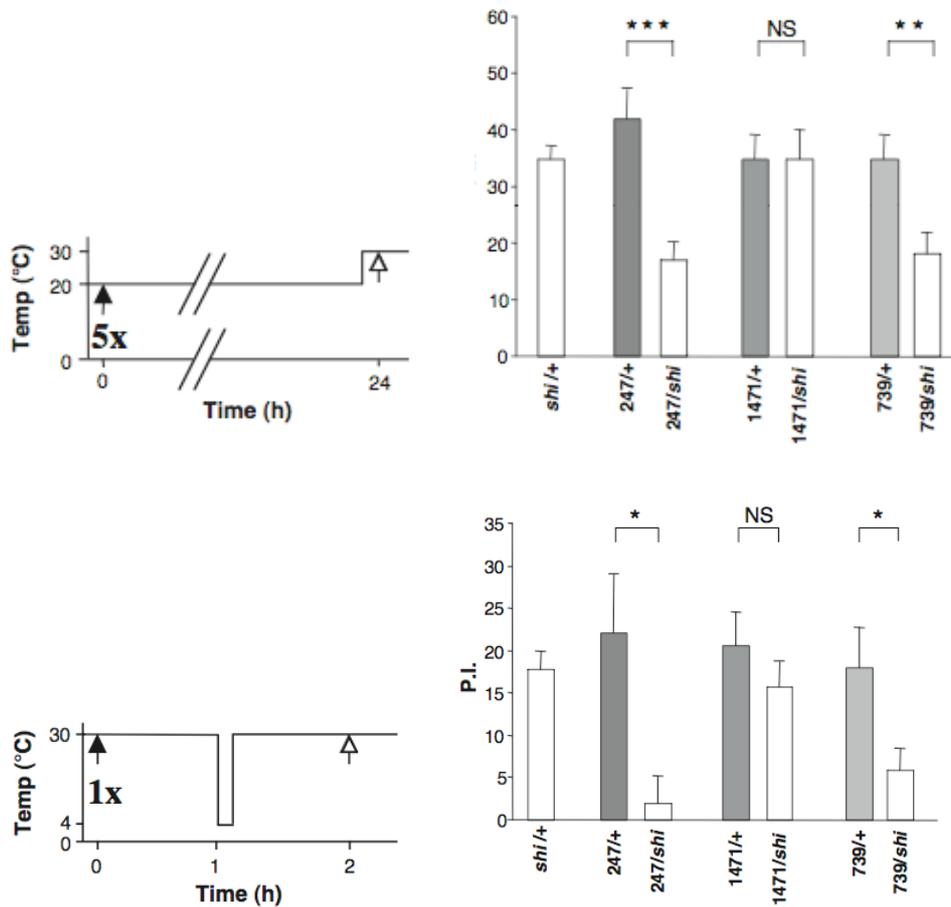


Figure 14 : Les mémoires consolidées impliquent les mêmes groupes de neurones

Le blocage des lobes α/β , lors de la restitution conduit à une chute de mémoire après conditionnement espacé. Ces lobes sont donc essentiels pour la restitution de la mémoire à long terme. La MRA dépend également des lobes α/β (Isabel et al; 2004).

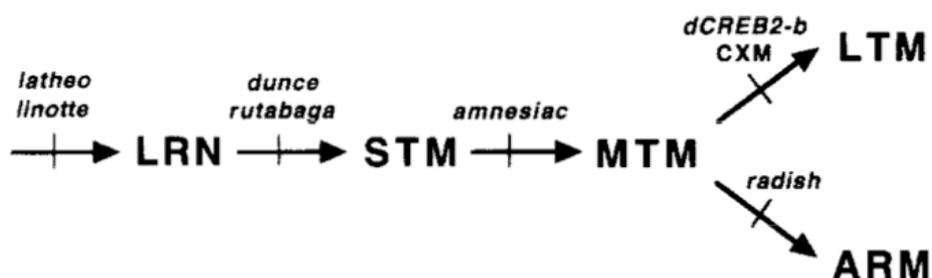
La mémoire à long terme a donc besoin d'une signalisation *via* les corps pédonculés pour qu'il y ait restitution de l'information, alors que l'acquisition ou le stockage aurait lieu en amont de la sortie des neurones des corps pédonculés (pas d'effet lorsque les neurones sont bloqués durant l'apprentissage ou la phase de consolidation (Dubnau, Grady et al., 2001; McGuire, Le et al., 2001).

c- La dynamique des phases de mémoire

Comme nous venons de le voir au cours de ces différents paragraphes et chapitres, en fonction du type de conditionnement, des mémoires aux propriétés différentes et aux multiples localisations sont générées. Néanmoins celles-ci sont liées les unes aux autres et le passage d'un type de mémoire à un autre sous-entend des mécanismes moléculaires bien précis. De plus, l'étude de pathologie humaine ou de lésions causées par divers traumatismes par le biais d'étude cognitive montre que certaines phases de mémoire sont atteintes et d'autres non. Il existe donc des juxtapositions de différentes mémoires, différentes phases qui apparaissent ou se transforment. La formation de la mémoire à long terme est d'ailleurs caractéristique car elle n'apparaît que sous certaines conditions. Les différents corrélats biochimiques et les cascades de signalisation sont par ailleurs supposés être conservés au cours de l'évolution.

Chez la drosophile un premier modèle de dynamique des phases de mémoire a été présenté en 1994 par l'équipe de Tim Tully (Tully, Preat et al., 1994). Ce modèle proposait qu'après un seul cycle ou après un conditionnement massé 3 formes de mémoire coexistaient : la mémoire à court terme, d'une faible durée de vie ; la mémoire à moyen terme qui durait quelques heures ; et enfin la mémoire résistante à l'anesthésie par le froid. Par contre la mémoire à long terme dépendante de la synthèse protéique ne se formait qu'après plusieurs cycles espacés (figure 15). À cette époque, les chercheurs supposaient que les phases de mémoire s'enchaînaient de manière linéaire. C'était également la manière la plus simple pour proposer un modèle. Grâce à l'étude des mutants *dnc*, *rut*, *rsh* et *amn* et en les soumettant à différents protocoles de conditionnement, le modèle suivant fut proposé.

Figure 15 : Modèle initial de la dynamique des phases de mémoire

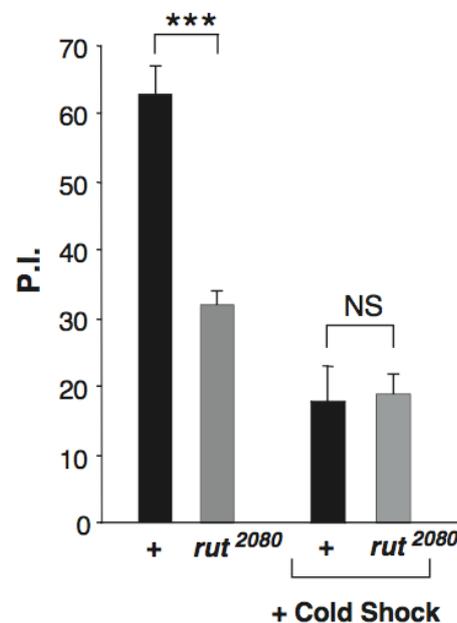


L'apprentissage est normal chez les mutants *dunc* et *rut*, mais leur mémoire à court terme est affectée. Chez les mutants *amn* la mémoire à court terme est normale, alors qu'à moyen terme il y a un défaut. Enfin, et cela en fonction du conditionnement, on génère une mémoire qui persiste dans le temps qui est soit de la mémoire résistante à l'anesthésie (pas affectée par un choc froid) abolie dans le mutant *rsh*, soit de la mémoire à long terme qui dépend de la synthèse protéique et du gène dCREB2-b.

Néanmoins ce modèle souffrait de plusieurs incohérences. Ainsi un choc par le froid est censé affecter la MRA, qui d'après le modèle présenté découle de manière linéaire du gène *rut*. Or, chez les individus *rut* soumis à un choc par le froid, la mémoire n'est pas différente des contrôles (figure 16).

Figure 16 : MRA normale chez Rutabaga

Les individus rutabaga présentent une MRA normale. Après un seul cycle de conditionnement, 2h plus tard, ceux-ci montrent un défaut de mémoire. Cette chute n'est pas le fait d'un défaut de MRA. Après un choc thermique par le froid, qui élimine la mémoire labile, 2h après un seul cycle de conditionnement, les individus CS ou *rut* présentent les mêmes scores (Isabel et al., 2004)



De la même manière, cette forme de mémoire est normale chez les mutants *amn* (Folkers, Drain et al., 1993). Le gène *amn* est supposé activer la voie métabolique de l'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase Rut. Ainsi la MRA n'est pas totalement dépendante de la MCT/MTM qui sont des voies d'apprentissage dépendantes de l'AMPc. Il y aurait donc deux voies possibles d'apprentissage. L'une qui dépendrait de l'AMPc via *dnc*, *rut* et *amn*, et une autre qui serait basée sur d'autres mécanismes moléculaires qui dépendrait de *rsh* et donnerait la MRA. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des mutations nulles concernant des enzymes de la voie métabolique de l'AMPc n'affectent pas totalement leur

mémoire immédiate (Tully and Quinn 1985). La question est ensuite de savoir si ces deux voies d'apprentissage ont lieu dans les mêmes structures du cerveau.

Pour répondre à cette question Guillaume Isabel, chercheur de l'équipe de Thomas Prémat, analysa plus en détail les capacités de mémorisation du mutants *ala*. Pour cela il les soumit à différents protocoles de conditionnement et testa leur mémoire à différents temps. Il établit ainsi une courbe de rétention en fonction de l'apprentissage chez des individus n'ayant plus leurs lobes verticaux. Bien que tous les individus présentent les mêmes capacités d'apprentissage et la même mémoire à court terme, ceux ayant subi le long protocole présentent une chute plus rapide et radicale de mémoire. Ainsi 5h après la fin du conditionnement les individus sans lobes verticaux, ayant plus appris, présentent une moins bonne mémoire que ceux n'ayant appris qu'une seule fois. Plus les individus sans lobes verticaux apprennent intensément et moins ils retiennent (figure 17).

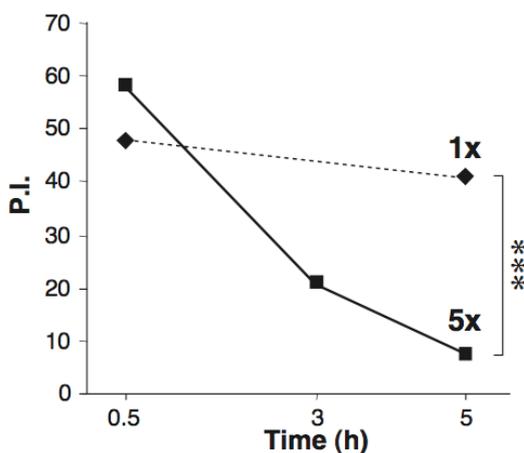


Figure 17 : Plus les individus *ala* sans lobes α/α' apprennent intensément, et moins ils retiennent

Partant du fait que 5h après un conditionnement, la mémoire mesurée est majoritairement de la MRA, et qu'après un conditionnement espacé, c'est de la MLT qui est générée, la baisse ici observée est due à un mécanisme d'effacement. Il y aurait une compétition entre MRA et MLT qui est ici mise en évidence par le fait que la MLT ne peut se stabiliser car les lobes verticaux sont absents (Isabel et al., 2004).

L'ensemble de ces données permet de proposer le modèle suivant. Il y a ainsi deux voies d'apprentissage l'une dépendante de l'AMPC l'autre étant abolie chez les mutants *rsh*. Un conditionnement espacé génère de la MLT et efface la MRA, ces mémoires consolidées étant localisées dans les mêmes groupes de neurones mais basées sur des propriétés biochimiques distinctes.

Un stimulus rencontré une fois, ou de manière répétée génère une mémoire semi stabilisée qui ne nécessite pas une cascade biochimique coûteuse en énergie, alors qu'un événement rencontré plusieurs fois de manière indépendante et répété ayant une grande

signification en terme de survie, est stocké de manière plus durable au détriment de sa rétention sous forme de MRA (figure 18).

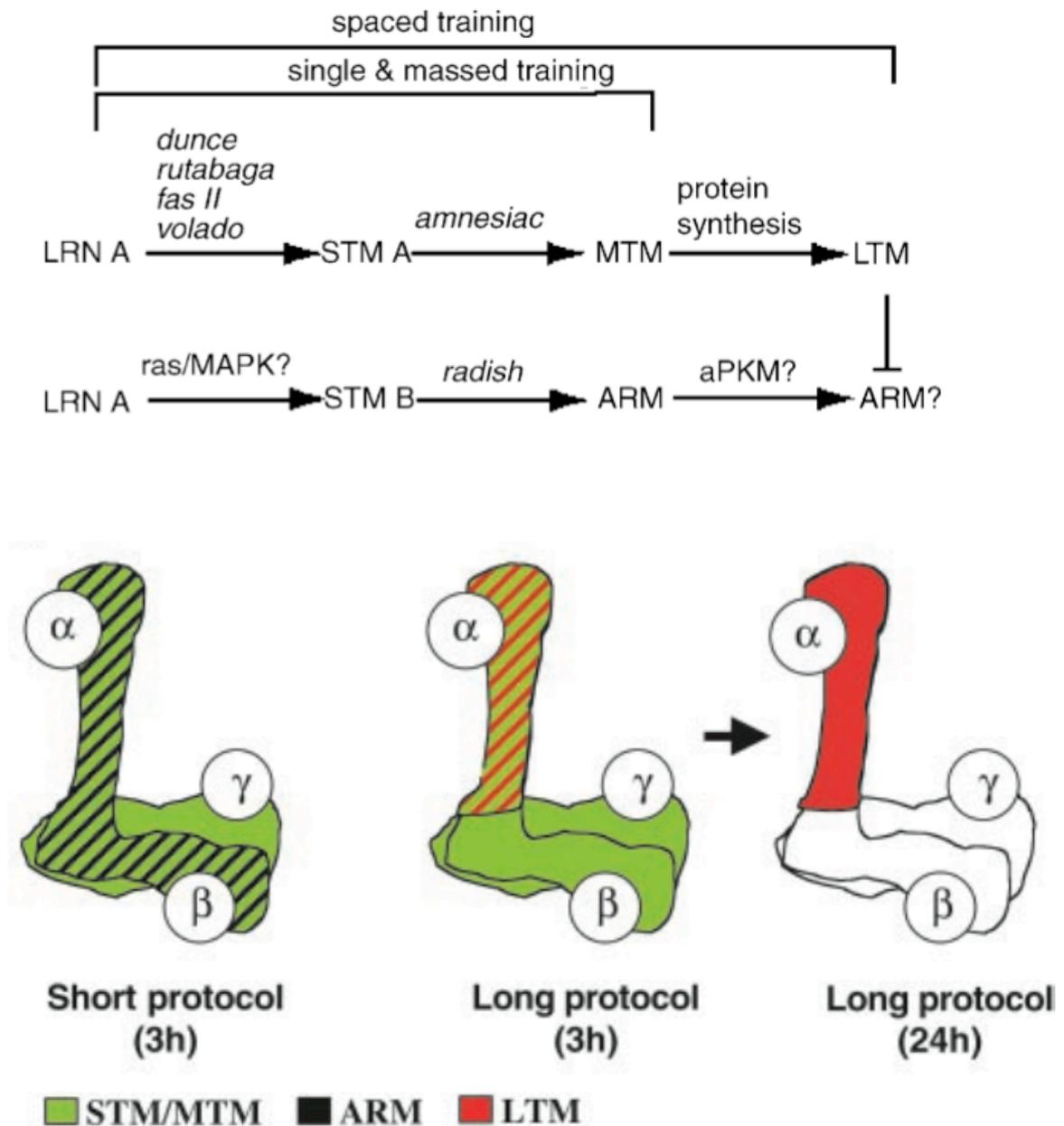


Figure 18 : Nouveau modèle de dynamique des phases de mémoire

Modèle de compétition de phase d'après Isabel et al., (Isabel, Pascual et al., 2004). Après un un seul cycle de conditionnement, MRA et MCT coexistent dans les lobes $\alpha/\beta/\gamma$. Après un protocole espacé, à 3h la MLT prend la place de la MRA dans les lobes α , avec ce qui reste de MCT dans les lobes $\alpha/\beta/\gamma$. 24h après un protocole espacé il ne reste plus que de la MLT.

Le but de mon projet de recherche était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la MLT. Pour cela nous avons exploité la capacité de notre laboratoire à pouvoir conditionner de manière semi-automatique un grand nombre de lignées en parallèle. Nous avons alors décidé de cribler des lignées P-Gal4 présentant un patron d'expression au niveau des corps pédonculés, et qui pouvait ainsi potentiellement perturber l'expression d'un gène requis dans la mise en place de la MLT. Ainsi après un premier crible portant sur cette phase de mémoire, nous avons vérifié les autres phases de mémoire, ainsi que les différentes sensibilités sous-jacentes à ce protocole. Une fois la caractérisation comportementale effectuée, nous nous sommes concentrés sur la biologie moléculaire de ce(s) gène(s). Nous avons identifié ainsi le site d'insertion du transposon par une PCR-Rescue. Puis nous avons confirmé l'implication de ce(s) gène(s), en utilisant les techniques de RNAi inductibles. Le but de ce travail est donc d'étoffer les connaissances sur la mise en place de la MLT, découvrir de nouvelles voies métaboliques impliquées dans ce type de mémoire.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A Elevage des mouches

Les drosophiles sont conservées dans des étuves régulées à 18°C, sur un milieu agar-maïs-levure. L'humidité y est régulée aux alentours de 70%.

Notre souche référence à la base de nos expériences de comportement est la souche sauvage Canton-Special ou CS. Afin de s'affranchir d'un effet dû à une différence de fond génétique, toute mutation étudiée est replacée dans un contexte génétique CS. Ainsi, les variations de phénotype observées ne pourront pas être imputées aux différences de fond génétique, mais bien à la présence de telle ou telle mutation.

Lors d'expérience de transgénèse, la souche utilisée dans laquelle nous effectuons nos injections est la souche w^{1118} , qui bien qu'ayant les yeux blancs, possèdent le même fond génétique que nos CS.

B Biologie Moléculaire

I La PCR-Rescue

Si une lignée mutée de drosophile présente un phénotype intéressant du fait de l'insertion d'un transposon, l'une des premières questions à se poser est de savoir où est inséré ce transposon et quel(s) gène(s) affecte t'il ? Le protocole qui consiste à identifier le site d'insertion d'un transposon, et que nous avons utilisé est la PCR-rescue. Elle consiste à extraire l'ADN total de la drosophile et à le couper en petits fragments grâce à des enzymes de restriction reconnaissant des sites de 4 paires de base. De nombreux fragments sont ainsi générés. Cet ensemble de fragment d'ADN est alors placé dans un grand volume, en présence d'une ligase. Ainsi chaque fragment se refermera sur lui-même, et non avec d'autres. Une PCR est ensuite effectuée en utilisant comme oligos des séquences spécifiques du transposon. La séquence amplifiée, en plus de contenir une partie du transposon, correspond à la région adjacente au site d'insertion. Grâce au séquençage total du génome de la drosophile, il est aisé de retrouver quels sont les gènes potentiellement affectés par l'agent mutagène.

1. Extraction d'ADN pour PCR-Rescue

Une trentaine de mouches sont nécessaires pour ce protocole. Après avoir été endormies et placées dans un tube Eppendorf, elles sont maintenues au moins 30min à -80°C. Elles sont ensuite écrasées dans 400µl de buffer d'extraction (Tris-HCl 100mM ph=7,5, EDTA=100mM, NaCl=100mM, SDS 0,5%). Ce broyat est placé 30 minutes à 65°C. On rajoute 800µl d'une solution de LiCl/KAc (1 volume de Kac 5M, et 2,5 volume de LiCl 6M) et on incube sur la glace pendant 10min. La solution est ensuite centrifugée pendant 15min à température ambiante. On obtient alors une solution avec 3 phases : un culot protéique et de débris cellulaires, une couche lipidique à la surface, et une solution aqueuse contenant l'ADN. C'est donc le millilitre de supernageant qui est récupéré auquel on ajoute 600µl d'isopropanol pour le faire précipiter. Puis l'ADN est nettoyé avec de l'éthanol à 70%, et resuspendu dans 150µl de TE (Tris-EDTA).

2. Digestion de l'ADN total pour PCR-Rescue

10µl d'ADN sont placés dans un tube Eppendorf en présence d'une des endonucléases de restriction suivante : Sau3A I, Msp I, HinP1 I, pour un volume de réaction de 20µl. Après digestion, l'enzyme de restriction est inactivée par chauffage.

3. Ligation pour PCR-Rescue

10µl d'ADN génomique digéré sont placés dans un volume final de 400µl en présence de ligase. L'ensemble est placé à 18°C toute la nuit. L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol sur de la glace, puis séché avec le Speed Vac, et resuspendu dans 150µl TE.

On obtient ainsi la matrice des expériences de PCR.

4. PCR pour PCR-Rescue

Elle est effectuée dans un volume final de 50µl en utilisant 10µl de matrice, 5 µl de tampon 10X (soit 1X final), 3µl de MgCl₂ à 25mM (soit 1,5mM final), 1µl de dNTP 10mM (soit 0,2mM final pour chaque nucléotide, et 0,5µl de Taq polymérase (5u/µl soit 2,5u au final).

- 1^{er} jeu

PGawB-Upp : gatggcttgccttctctgaaaacggaccc

PGawB-Low : cccgtcgatagccgaagctagcttaccgaag

Si un produit d'amplification n'apparaît pas, il est possible d'effectuer, après avoir nettoyé le produit de la réaction, une seconde PCR en utilisant un jeu d'oligo plus interne par rapport au précédent. On amplifie ainsi un produit d'amplification faiblement amplifié.

- 2^{ème} jeu

oligo-interne : ccgcacacaaccttctctctcaa

1095 NES : gggttcttggcgacggttct

Si aucun produit n'est obtenu, la PCR-Rescue est à recommencer depuis le début. Par contre, si on observe un produit d'amplification celui-ci est cloné dans le vecteur pGEM-Teasy de Promega, selon les instructions du kit. Il est ensuite envoyé à séquencer.

II Extraction d'ADN pour amplifier des fragments d'ADN

Une mouche du génotype d'insert est placée endormie dans une tube Eppendorf. Elle est ensuite écrasée dans un tampon d'homogénéisation (Tris-HCl 10mM pH=8,2, EDTA=1mM, NaCl=25mM, Protéinase K= 200mg/mL) pendant quelques instants. Le broyat est alors placé 2 heures dans une étuve à 37°C. Puis la protéinase K est inactivée en chauffant l'ensemble à 95°C pendant 2 min. Cette préparation peut alors être conservée pendant 1 mois à 4°C. Pour effectuer une PCR dans un volume de réaction de 50µl, 5µl sont suffisants.

III Construction des lignées pUAS-RNAi

1. Principe du RNAi

L'introduction dans une cellule d'un ARN double brin permet de mettre sous silence l'expression d'un gène ciblé. Cette action est extrêmement spécifique et intervient de manière post-transcriptionnelle. Ce mécanisme fonctionne dans un très nombre d'organismes et se révèle être un outil très puissant (Hammond, Caudy et al., 2001). En effet, en 2006, plus de 14000 articles scientifiques faisaient référence à cette technique d'interférence ARN, montrant l'extraordinaire intérêt que les chercheurs lui portent. L'utilisation de siRNA pour étudier la fonction d'un gène chez les mammifères est devenue en très peu d'années une technique de base, utilisée par des biologistes de toutes disciplines

Les ARN double-brins présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par une ribonucléase de type III appelée Dicer. Celle-ci clive l'ARN double brin toutes les 21 à 25 paires de bases. Dicer transfère alors les siRNA vers un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Un des brins du siRNA, dit passager ou sens, est éliminé tandis que l'autre dirige le complexe RISC vers les RNAm possédant une séquence complémentaire au brin guide. Si la complémentarité entre le siRNA et l'RNAm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'RNAm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage. Ce mécanisme est donc très spécifique de la séquence du siRNA et de sa cible, l'RNAm. Dans certains cas, on peut choisir un siRNA capable de cliver un RNAm porteur d'une mutation ponctuelle sans affecter l'RNAm sauvage. Le fonctionnement est représenté figure 19.

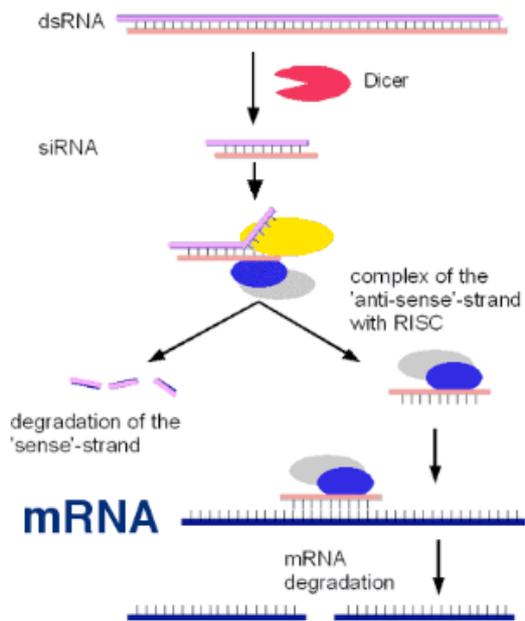


Figure 19: Représentation schématique du mécanisme du RNAi

Les fragments d'ARNdb sont coupés par Dicer pour former les fragments de siRNA. Ces fragments sont ensuite incorporés au complexe multiprotéique RISC. Le brin sens de l'ARNdb est dégradé, laissant le brin antisens guidé le complexe jusqu'à la séquence complémentaire pour effectuer le clivage.

2. Technique de construction du RNAi

L'un des problèmes dans l'injection d'ARNdb chez des embryons de drosophile est que bien que l'extinction du gène soit efficace, celle-ci est transitoire et ne se transmet pas à la descendance. Pour contourner ce problème l'équipe du Pr. Richard Carthew a développé une technique profitant des progrès de la biologie moléculaire et de transgénèse chez la drosophile (Lee and Carthew 2003). Pour exprimer de manière stable un ARNdb, des séquences répétées inversées sont placées en aval d'un promoteur et espacées par un intron, permettant de reproduire la structure en épingle à cheveux caractéristique des ARNdb. Ainsi en croisant une lignée portant cette construction inversée-répétée avec une lignée portant un pilote d'expression, le RNAi s'exprimera dans la descendance en fonction du pilote d'expression (figure 20).

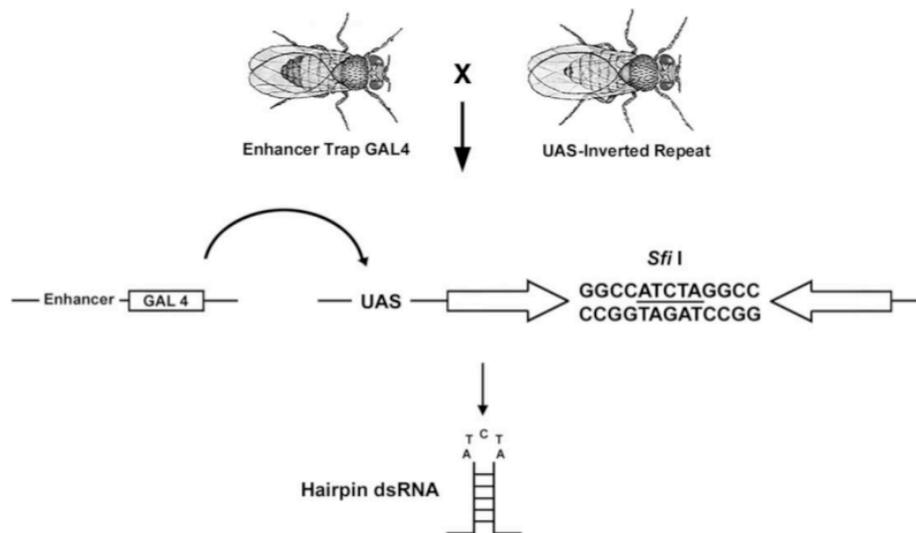


Figure 20 : Principe génétique de l'activation des RNAi

La séquence inversée-répétée est placée en aval d'une séquence UAS. Quand une lignée UAS est croisée avec une lignée ayant un pilote d'expression Gal4, la descendance F1 est hétérozygote et contient les deux constructions, l'UAS et le Gal4. Ainsi l'expression « tissu-spécifique » de cette séquence permet d'induire le RNAi chez la drosophile.

3. Construction de la séquence inversée-répétée

L'avantage de ce protocole vient du fait qu'il est facile d'insérer les différents fragments du fait de la complémentarité de certains sites de restriction. Le vecteur utilisé pWIZ dérive du vecteur pUAS. Il contient au milieu du multisite de clonage (MSC) une séquence espaceur avec de part et d'autre des sites de restriction AvrII et NheI (figure 21).

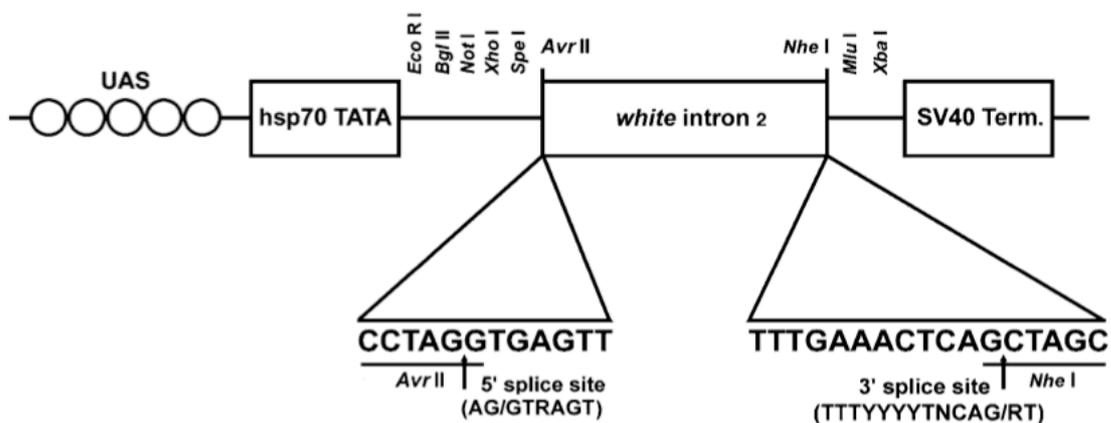


Figure 21 : Représentation du MSC dans le vecteur pWIZ

De part et d'autre du MSC existant chez le vecteur puas, un espaceur qui correspond à un intron du gène white et d'une taille de 71pb est présent pour pouvoir faire la boucle.

On amplifie à partir du génome une séquence spécifique de la cible. On utilise pour cela des oligos ayant des sites de restriction *Xba*I aux extrémités. Ce fragment est ensuite cloné dans le vecteur pGEM-T (promega) selon les instructions données. Le clone est alors séquencé. Le fragment d'intérêt est extrait du plasmide par une digestion *Xba*I puis purifié après migration. On ouvre le vecteur pWIZ avec *Avr*II. Les sites de restriction *Avr*II et *Nhe*I sont compatibles avec les sites de restriction *Xba*I. Le fragment nettoyé et le vecteur ouvert sont ensuite liés ensemble. Après avoir vérifié que le premier fragment s'est bien inséré dans le vecteur, il faut insérer le second. Pour cela on procède de la même manière, en ouvrant le vecteur avec l'enzyme *Nhe*I. L'explication du protocole est simplifiée sur la figure 22.

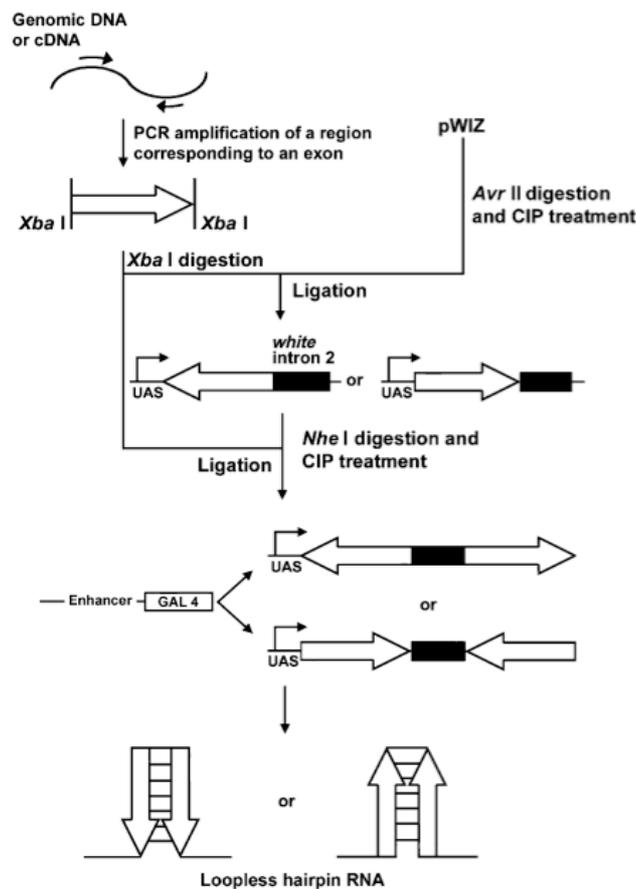


Figure 22 : Principe de construction de RNAi à partir du vecteur pWIZ

Un fragment d'ADN génomique est amplifié par des oligos ayant des sites de restriction *Xba*I à leur extrémité. Après avoir ouvert le vecteur via *Avr*II, on y insère un premier fragment. Après ligation, on ouvre de nouveau ce vecteur avec *Nhe*I, et on insère un second fragment. Par digestion enzymatique, on vérifie les sens d'insertion des inserts pour obtenir une séquence inversée-répetée.

4. Choix des oligos

a. CG11371 :559pb

3'CG11371
cgctagtctagaCCTGTCCGGTACGCATGGCTTT
XbaI
5'CG11371
cgctagtctagaCCACGTGCCGGAGTCCGAAA
XbaI

- CG31191 : 773pb

31191-for-RNAi
cgctagtctagagggccCCCCACCATTACCGCCCGATCA
XbaI ApaI
31191-rev-RNAi
cgctagtctagagagctcCCATGTTCCATGAGGGTCTGTAT
XbaI SacI

- CG5630 : 298pb

5630-For-RNAi2
cgctagtctagagggccGGCGTCCGTCGAACAGCATA
XbaI ApaI
5630-rev-RNAi n°3
cgctagtctagagagctcTGGTTTTGGAAGGCGTCCAG
XbaI SacI

Pour pouvoir déterminer avec plus de facilité le sens d'insertion des deux fragments, dans le cas des gènes CG31191 et CG5630, nous avons construit nos oligos en y ajoutant un site de restriction supplémentaire. Il s'agit d'un site unique situé entre le site XbaI, et la séquence du RNAi. Ainsi grâce à une double digestion nous pouvons savoir si les fragments sont insérés en sens ou anti-sens.

Une fois le sens d'insertion dans les clones vérifié, l'ADN est préparé pour la transgénèse avec le kit Midiprep de Qiagen.

5. Transgénèse

Nous envoyons nos constructions, ainsi que notre souche de référence au groupe BestGene spécialisé dans l'injection chez la drosophile.

IV Northern blot

1. Préparation des échantillons

Les extraits de RNAm étudiés sont issus de tête de mouche. Une centaine de mouches sont placées dans un tube Falcon puis plongé dans l'azote liquide pour la congélation. Grâce à l'action du vortex corps et tête sont séparés via l'utilisation de tamis. Les têtes sont alors récupérées dans un nouveau tube falcon (ou tube Eppendorf) déjà refroidi avec de l'azote liquide. Pour faire la poudre de tête de mouche, on place un mortier dans la carboglace et on le fait refroidir avec de l'azote liquide versé dans le mortier. Une fois qu'il est froid, on place les têtes dans l'azote liquide dans le mortier. On commence à broyer doucement avec le pilon une fois qu'il ne reste pas trop d'azote liquide dans le mortier. Une dizaine de têtes suffisent pour extraire $\pm 1\mu\text{g}$ d'ARN. Autour de 80 têtes pour $\pm 25\mu\text{g}$. On effectue ensuite l'extraction d'ARN grâce au Kit RNeasy Plant minikit de Qiagen. Par la suite les échantillons sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 et 280nm.

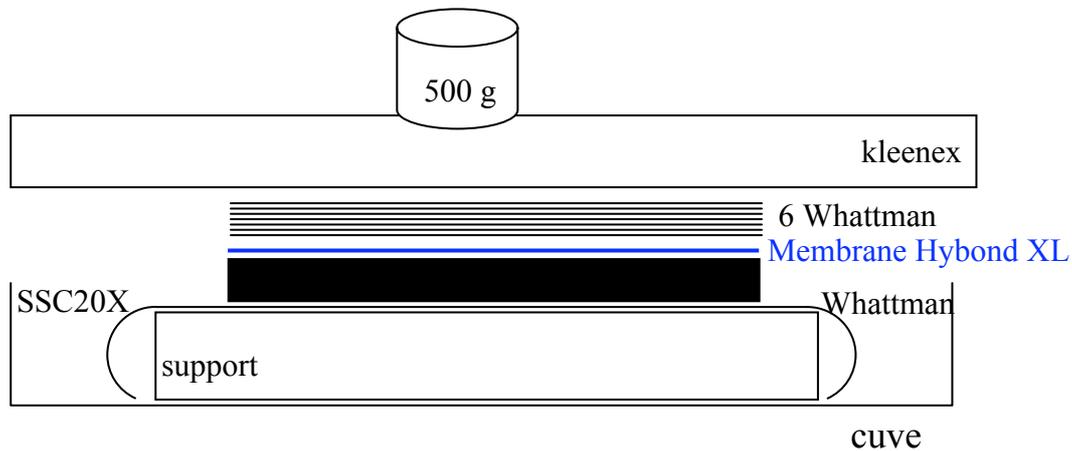
2. Migration des échantillons

Le gel d'agarose est préparé dans une cuve biorad. On utilise 1,92g d'agarose propre, 120ml d'eau milliQ, 24ml de Formaldéhyde et 16 ml de MEN 10X. Dans les échantillons préparés sont ajoutés 2-3 μl de tampon charge avec bleu de bromophenol, pour avoir un front de migration.

La migration s'effectue à 70 volts. On vérifie aux UV que la migration s'est bien déroulée.

3. Transfert

Le transfert sur une membrane de nitrocellulose Hybond N+ (Amersham) s'effectue grâce à un bain de SSC20X dans lequel trempe un papier Whatmann. Le transfert s'effectue par capillarité par les kleenex posés dessus, et est représenté dans le schéma qui suit.



Après 24h de transfert on vérifie par UV que les ARN ont bien transférés. On place la membrane 2h à 80°C avec du papier Whatman, pour accrocher les ARN à la membrane.

4. Hybridation

La membrane est mise à bloquer une heure avec le tampon d'hybridation. Ce tampon est une solution de Na_2HPO_4 (pH = 7,2) à 0,25 M (voir Sambrook et al., 1989) avec du SDS à 7% et 1mM d'EDTA. Les sondes sont dénaturées à 95°C pendant 4min. L'hybridation se fait toute la nuit à 65°C. Le lendemain les rinçages se font toujours à 65°C avec des bains de SSC de plus en plus stringent. :

- * SSC 2X , SDS 0,1%
- * SSC 1X , SDS 0,1%
- * SSC 0,5X , SDS 0,1%

Ainsi après une première hybridation, pour en faire ensuite une seconde avec une sonde contrôle, il faut soit faire « décroquer » la membrane pendant quelques jours, soit effectuer un stripping. Pour cela, nous faisons trois lavage à 65°C de 5 minutes chacun avec 1% de SDS en ébullition dans un plateau et avec un peu d'agitation sans laisser la membrane sécher. Après le troisième lavage, nous mettons directement la membrane dans une solution d'hybridation, pendant 1 heure (minimum) avant de mettre la nouvelle sonde (dénaturée).

5. Synthèse des sondes et transcription inverse

Les séquences sélectionnées s'hybrident sur l'extrémité 3' des RNAm

- Transcrit détecté pour CG5630 : 519pb
Oligo forward pour CG5630
CACAGCAAAGTTGGGGCTGCCCAA
Oligo Reverse pour CG5630
CCCTGTTTGTGGGACAGGCCTT

- Transcrit détecté pour CG31191 : 773pb
Oligo forward pour CG31191
CCCCACCATTACCGCCCGATCA
Oligo Reverse pour CG31191
CCATGTTCCCTCATGAGGGTCTGTAT

- Transcrit détecté pour CG11371: 560pb
Oligo forward pour CG11371
CCACGTGCCGGAGTCCGGAAA
Oligo Reverse pour CG11371
TTTCGGTACGCATGGCCTGTCC

Nous prenons 3µg d'ARN total que nous diluons dans 9,6 µl d'H₂O. L'ARN est ensuite dénaturé 8 minutes à 75°C, et placé 2 minutes dans un bac à glace. L'ARN est ensuite reconcentré dans le culot du tube Eppendorf grâce à un petit spin, et à nouveau placé dans le bac à glace. Nous ajoutons ensuite : 9,9µl de 2X RT mix déjà faite ; 4µl de 5X First Strand Buffer ; 2µl de Random 6mers (0.5 µg/µl) ; 2µl d'oligo RT (0,5µg/µl); 0,4µl de dNTP à 25 mM chacun ; 2µl de DTT à 0,1 M ; 1µl RNasin (Promega). Nous laissons 20 minutes à 25°C pour que l'amorce s'hybride à l'ARN. Nous ajoutons 1 µl de Super-Script Reverse Transcriptase (Invitrogen). Nous laissons incubé 60 minutes (ou selon la taille à retro-transcrire) à 45°C pour synthétiser le cDNA. Ensuite, nous le laissons 10 minutes à 75°C.

Les sondes radioactives utilisées sont élaborées en marquage aléatoire à partir du système "Readiprim H" (Amersham) sur 50 ng d'ADN en présence de 5 µCi de dCTP α³².

Après 1 heure de marquage à 37°C, la sonde est purifiée sur colonne (mini quick spin DNA columns Roche) et dénaturée pendant 5 min à 95°C avant utilisation.

V Western blot

1. Extraction des échantillons

Les extraits protéiques étudiés sont issus de tête de mouche. Une centaine de mouches sont placées dans un tube Falcon puis plongé dans l'azote liquide pour la congélation. Grâce à l'action du vortex corps et tête sont séparés via l'utilisation de tamis. Les têtes sont alors récupérées et broyées dans un tampon de lyse (saccharose 100mM, K₂HPO₄ 40mM, EDTA 30mM, KCl 50mM, Triton 0,25%, DTT 10mM, PMSF 0,5mM, CLAPS 1x). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes, à 4°C, à 10000rpm. Les protéines sont situées dans la phase aqueuse, et soit directement congelées et conservées à -20°C, soit directement utilisées après un passage à 95°C qui détruit les structures quaternaires.

2. Migration et transfert

La migration de protéine se fait via 2 gels successifs. Un gel de concentration est coulé au-dessus d'un gel de séparation permettant ainsi une entrée homogène de l'échantillon. Entre 30 et 50µg d'échantillons protéiques sont mis à migrer sur gel d'acrylamide 7,5%. À la fin de la migration, le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose (0,65mA/cm², Amersham).

3. Traitement de la membrane

La membrane est mise à bloquer pendant 1 à 2h dans une solution de PBS 1x/lait5%. Elle est incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS 1x/lait 5% à 4°C avec agitation. Le lendemain, la membrane est rincée 4 fois 15 minutes dans du PBS 1x/tween 20 0,05%. L'incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans PBS 1x/tween 20 0,05% dure 2 heures à température ambiante avec agitation. La membrane est rincée 4 fois 15 min dans PBS 1x/tween 20 0,05%. Elle est incubée 2 min avec les réactifs ECL (Pierce). Le signal est révélé par développement sur films ECL (Amersham).

VI RT-PCRq

La mise en place de la mémoire à long terme nécessite la synthèse *de novo* de certaines protéines. Un moyen de montrer l'implication d'un gène dans un processus est de montrer que son expression varie de manière spécifique dans ledit processus. Nous avons comparé, dans le cas d'un conditionnement espacé, l'expression des transcrits d'intérêt par rapport aux transcrits de gène de ménage, puis effectué le même rapport dans le cas d'un conditionnement ne conduisant pas à la mise en place de la mémoire à long terme. Un ratio entre ces deux rapports est ensuite fait pour pouvoir quantifier la variation du transcrit d'intérêt.

1. Principe

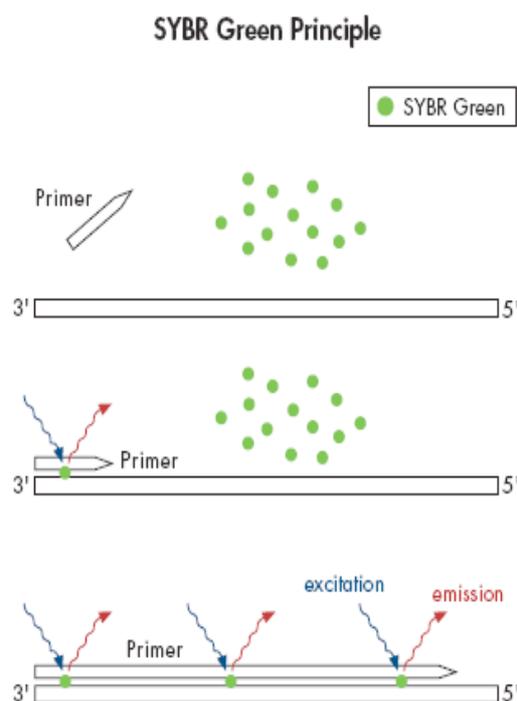


Figure 23 : Principe de la RT-PCR

Grâce aux primers spécifiques, un produit d'amplification est obtenu à partir des RNAm. Le Sybr est intercalé entre les brins et émet après excitation. L'émission est alors proportionnelle à la quantité d'RNAm présent.

A partir des brins d'RNAm isolés, nous

2. Conditionnement

procédons à des étapes d'amplification. Plus il y a de produit amplifié, plus le SYBR s'intercale entre les brins. Celui-ci émet de la fluorescence une fois intercalé. L'émission de fluorescence augmente avec les cycles de PCR (figure 23). On quantifie à chaque nouveau cycle de PCR, l'émission de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de matrice d'ADN elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ARN.

Nous comparons l'effet d'un conditionnement espacé générateur de mémoire à un traitement particulier. Il est également composé de 5 cycles espacés par 15 minutes de latence, mais les chocs électriques et les arrivées des odeurs sont décalées. Il n'y a ainsi pas d'association effectuée, et donc pas de mémoire formée. Ce conditionnement dure un tout petit peu plus longtemps que le conditionnement espacé classique (1h40 contre 1h30), mais présente les mêmes caractéristiques³.

3. Extraction d'ARN

80 à 100 mouches sont placées dans un tube Falcon et immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Les têtes sont séparées du corps après un passage au vortex (le cou se brise). L'extraction des ARN totaux des têtes de drosophile est effectuée grâce aux kits RNeasy Plant Mini Kit de chez Qiagen. La quantité et la qualité de l'extraction sont déterminées par mesure spectrophotométrique à 260nm et 280nm. Après extraction, les RNAm sont conservés à -80°C.

4. Protocole

Nous avons utilisé le kit « one step » de Qiagen. Nous avons déposé dans un capillaire 10 µl du QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix pour une concentration finale en Mg²⁺ de 4mM, et 0,2µl de QuantiTect RTmix. Ces deux tampons apportent la HotStarTaq DNA Polymerase spécifique, les dNTP nécessaires à l'élongation, ainsi que les conditions assurant l'étape de transcription et d'élongation. Les oligos sont à la concentration finale de 1mM.

La transcription inverse s'effectue à 55°C pendant 20 minutes grâce aux Omniscript®Reverse Transcriptase et Sensiscript®Reverse Transcriptase. Puis passage à l'étape de PCR en passant à 95°C. La HotStartTaq DNA Polymerase est alors activée, et l'élongation peut commencer. L'hybridation se fait à 52°C et dure 30 secondes et l'élongation à 72°C pendant également 30 secondes.

L'émission mesurée est dûe au SYBR Green, un agent intercalant. Plus il y a de

note³ : Un crible comportemental intégrant des expériences de RT-PCRq a également été effectué par le laboratoire de Tim Tully (Dubnau, Chiang et al. 2003). Dans ce cas les auteurs ont utilisé comme expérience contrôle un conditionnement massé qui génère une mémoire non dépendante de la synthèse protéique. Or ce conditionnement est composé de 5 cycles massés pouvant induire un stress important chez les individus conditionnés, et ainsi biaiser les résultats obtenus.

produit amplifié, plus le SYBR s'intercale entre les brins, et l'émission de fluorescence est importante. On quantifie à chaque nouveau cycle de PCR l'émission de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de matrice d'ADN, elle-même proportionnelle à la quantité initiale d'ARN.

5. Choix des oligos

Pour pouvoir correctement quantifier la quantité de transcrit, nous cherchons à amplifier une séquence spécifique de l'RNAm. Pour cela nous choisissons un couple d'oligo amplifiant un produit d'une centaine de paires de base, dont l'un des deux est à cheval sur deux exons séparés par un intron. Cet intron est représenté sur les séquences suivantes par une étoile.

- Sequence: CG 31191

CCTGGCCACCAGGCAGAGCAGCAGGACAAACAAGAGAGCCGGAAGTCTGCGGCTGGTGCTGCCACTGGACAGCGA
AGTTTCGATTCAT***CAA**CCACAAACTTCGTGGGCAAGTTCACGCAGAGTGTGCGCCGAATCGTGCAGGATGTGAAG
GACGAGGGGGCGCCAGTGAATGACG

Upper primer

5'-position : 72
Length : 19
Sequence : 5'-GCGAAGTTCGATTCATCAA-3'
3'-AACTACTTAGCTTGAAGCG-5'

Lower primer

5'-position : 149
Length : 18
Sequence : 5'-CTTCACATCCTGCACGAT-3'
3'-TAGCACGTCCTACACTTC-5'

PCR product

Position : 72 - 149
Length : 78 bp
GC% : 52,6 %

Tm(product) : 72,8 °C
Tm(annealing) : 53,7 °C

- Séquence pour CG5630

**TGCGGATTTCTCGATCTACAACCGTTCGTCTACGACTACTGCCAGGCCAATCTTTCAAATCAATGATAGTGAC
TTTG*TGACCTCGGCACCATCGTGGCGTCCGTCGAACAGCATACGCCGGCCGCCCCCACCCTCCCGTT
GTGGGACTGCCACCATGCGGCCAACGCAAGGCTGTCCACAA**

Upper primer

5'-position : 12
Length : 20
Sequence : 5'-**CGATCTACAACCGTTCGTCT**-3'
3'-TCTGCTTGCCAACATCTAGC-5'

Lower primer

5'-position : 89
Length : 18
Sequence : 5'-**GTGCCGAGGTCACAAAGT**-3'
3'-TGAAACACTGGAGCCGTG-5'

PCR product

Position : 12 - 89
Length : 78 bp
GC% : 47,4 %

Tm(product) : 70,7 °C
Tm(annealing) : 52,6 °C

- Sequence: CG 11371

**GCCCTGCTGAATCGTGGATTTAAAGCAGGAGAAGAAAAACGATTTCCCTAAAAGA*TGATAAGTGGGAGCGA
ACTGATGTTAGTTCTTCATCATCAAGAAACCGCCGAGGACGTAAATCAAAGATTGATTCCAACGTCGAGGATT
TTGGCGATGAAGAAAAAAGACTCTAGATGGGATGAAGACGATGACT**

Upper primer

5'-position : 41
Length : 20
Sequence : 5'-**CGATTTCCCTAAAAGATGAT**-3'
3'-TAGTAGAAAAATCCCTTTAGC-5'

Lower primer

5'-position : 104
Length : 18
Sequence : 5'-**CGGTTTCTTGATGATGAA**-3'
3'-**AAGTAGTAGTTCTTTGGC**-5'

PCR product

Position : 41 - 104
Length : 64 bp
GC% : 40,6 %

Tm(product) : 66,0 °C
Tm(annealing) : 47,9 °C

Les séquences utilisées pour quantifier le transcrite du gène Tubuline sont les mêmes que celles dans le cadre de l'analyse du gène crammer (Comas, Petit et al., 2004) ou de tequila (Didelot, Molinari et al., 2006).

- Tubuline

Tub Upp :

Sequence : **TTGTCGCGTGTGAAACTTC**

Tub Low:

Sequence : **CTGGACACCAGCCTGACCAAC**

Le produit PCR fait 80pb

6. Validation des expériences de RT-PCRq

Les expériences de RT-PCRq sont des expériences extrêmement sensibles. Il est donc très important d'avoir plusieurs paramètres fiables à vérifier pour valider un résultat. La dynamique d'amplification des PCR en général suit une courbe sigmoïde. Celle-ci comporte un point d'inflexion. Pour des dilutions successives d'un même échantillon, ce point d'inflexion est ainsi décalé de manière constante. On obtient alors une droite (qui est la valeur de ce point d'inflexion en fonction de la dilution) pour chaque gène étudié. Les paramètres sur lesquels nous nous sommes concentrés sont à la fois l'écart-type des quatre valeurs obtenues pour chaque droite, mais également la différence des coefficients directeurs. Les paramètres que nous avons choisis ($EC < 0,25$, et différence de coefficient directeur $< 0,6$) nous donnent des résultats qui restent dans les mêmes ordre de grandeur.

VII Comportement

1. Elevages et croisements

Les mouches sont élevées à 18°C, et sont issues de croisements constitués d'une cinquantaine de femelles pour au minimum vingt mâles. Ces croisements sont repiqués tous les trois jours pour éviter une accumulation d'individus de la descendance et la génération d'odeur de décomposition.

2. Préparation des mouches avant le conditionnement

La veille du conditionnement, une centaine de mouches à tester âgées de 24h à 3 jours sont placées dans des bouteilles contenant un mouchoir enfoncé dans le milieu, et conservées une nuit à 18°C et 50% d'humidité. Cette précaution présente l'avantage de les mettre dans un environnement neuf, et propre, limitant ainsi le contact avec un milieu humide où elles pourraient se coller. De plus la présence du mouchoir leur permet d'essuyer leurs pattes. Elles sont ensuite déplacées dans la pièce à conditionnement qui est à 25°C, 20 à 30 minutes avant le début de l'expérience.

Pour les expériences nécessitant l'utilisation du système Gene-Switch, ledit milieu est préparé le jour même. Avant que le milieu ne refroidisse et ne durcisse, il est complété avec du RU486 à la concentration finale de 200µM. Les individus sont placés dessus pendant 2 jours avant le conditionnement, et dans le cas d'étude de la mémoire 24h après l'apprentissage, elles sont de nouveau placées sur un milieu complété frais. Dans ce cas, nous n'utilisons pas de kleenex pour ne pas dessécher le milieu.

3. Préparation des odeurs

Les substances odorantes utilisées sont le 4-méthyl-cyclohexanol (MCH) et le 3-octanol (OCT), deux alcools naturellement répulsifs pour les mouches. Il n'y a pas aux concentrations utilisées de préférence pour l'une ou l'autre des deux odeurs. Leur préparation se fait par dilution de 58µl de MCH et de 48µl de OCT dans un volume prédéfini d'huile de paraffine Rectapur (environ 175mL), car ces alcools sont hydrophobes. Les dilutions utilisées sont donc de 3.60×10^{-4} pour l'octanol, et de 3.25×10^{-4} pour le 4-méthyl-cyclohexanol. Les bouteilles et les tubes plongeurs sont répartis en deux lots spécifiques. Ceux qui sont réservés pour l'odeur OCT et ceux qui le sont pour l'odeur MCH. On évite ainsi des mélanges d'odeurs qui pourraient par la suite interférer sur les expériences.

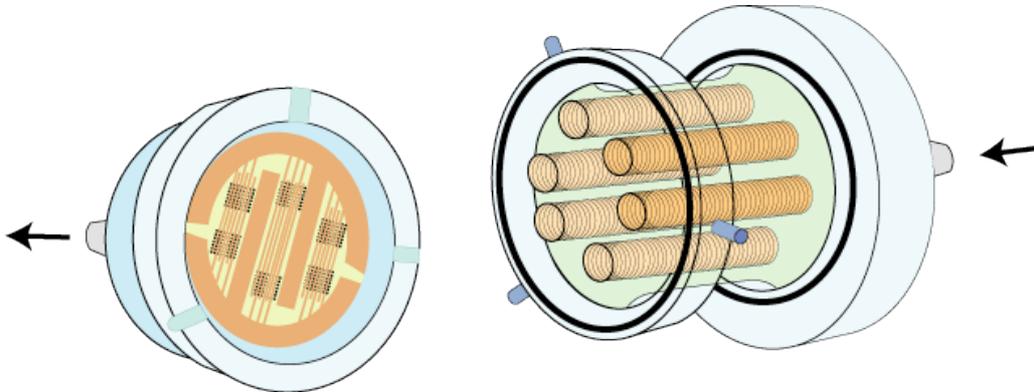
Une pompe à vide permet de faire barboter de l'air dans ces solutions et les odeurs diluées ainsi créées sont acheminées dans les chambres de conditionnement ou de test grâce à des tubes recouverts de téflon. Le débit est réglé à 2l/min pour chaque barillet pour le conditionnement (soit environ 300ml/min par chambre de conditionnement) et 800ml/min pour le test (soit environ 400ml/min par compartiment)

4. Le conditionnement pour la MLT

Il s'agit ici d'un conditionnement olfactif non opérant, de type pavlovien. Les mouches sont soumises à leur environnement et ne peuvent y échapper. Entre 50 et 100 mouches porteuses du même génotype sont enfermées dans des barillets. Chaque barillet contient 6 compartiments recouverts d'une grille électrifiable en cuivre. Le couvercle et le dos du dispositif sont également recouverts de cuivre de telle sorte que les mouches ne peuvent échapper aux chocs électriques. Après avoir vérifié qu'il y a une bonne circulation d'air et que le courant circule le long des grilles, les compartiments sont ensuite chargés à l'aide d'un pneumo-capturateur et d'une pièce circulaire laissant un seul des six compartiments ouverts. On peut ainsi charger le barillet tranquillement sans risquer de vider un compartiment précédemment rempli. Le barillet est ensuite branché sur la circulation d'air et le circuit électrique. L'ensemble est relié à un système informatique qui contrôle les différentes électrovannes assurant les débits d'air provenant des bouteilles d'odeurs, et la distribution des chocs électriques. Le conditionnement peut alors commencer. Il se déroule dans une pièce hermétique à 25°C et 70% d'humidité. Ces conditions permettent à la fois une meilleure évaporation des odeurs et une meilleure conductivité électrique. Les mouches reçoivent pendant 60 secondes 12 chocs électriques d'une amplitude de 60V et d'une période de 1,25secondes en présence de la première odeur : c'est le stimulus conditionné CS+. Cette première phase est ensuite suivie d'une période de repos de 45 secondes durant laquelle l'air est nettoyé par un courant d'air neutre. Ensuite les mouches sont exposées à la seconde odeur, non associée à des chocs électriques CS-. Le cycle est répété 5 fois avec une phase de repos de 15 minutes. Ce conditionnement est représenté sur la page suivante.

Protocole de conditionnement de mémoire à long terme

Le barillet à 6 positions



De 0 à 90 sec : émission d'air

De 1min 30 à 2 min 30 : émission de la première odeur associé aux chocs électriques.

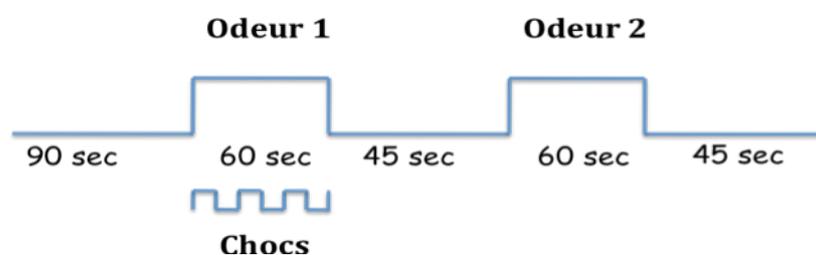
De 2 min 30 à 3 min 15 : rinçage de l'odeur avec de l'air.

De 3 min 15 à 4 min 15 : émission de la seconde odeur.

De 4 min 15 à 5 min : rinçage avec de l'air.

⇒ ce cycle est répété 5 fois avec une pause 15 minutes entre chaque cycle. On génère ainsi de la MLT.

Schéma d'un cycle de conditionnement



À la fin de la phase de conditionnement, un dispositif permet de positionner 6 tubes de nourriture en face des 6 compartiments afin de collecter les mouches conditionnées. Celles-ci sont ensuite transférées dans des bouteilles afin de leur assurer plus d'espace, et de générer le moins de stress possible. Puis ces bouteilles sont placées à 18°C et 50 % d'humidité pendant 24 heures.

On teste ensuite la rétention de ce conditionnement le lendemain grâce à une machine à test mise au point par T. Tully (Tully and Quinn 1985).

5. La phase de test de la MLT

Le test s'effectue sur des populations comprenant entre 30 et 50 individus (si possible) conditionnés. Il a lieu généralement 24h après le conditionnement. Grâce à un système coulissant, les mouches se retrouvent bloquées dans la machine à test, puis transférées dans une chambre où convergent les deux odeurs précédemment rencontrées. Elles ont alors un laps de temps défini, d'une minute exactement, pour se diriger vers l'une ou l'autre des deux odeurs. Elles se répartissent en fonction de leur préférence, influencées par leur mémoire, dans des tubes d'où proviennent les courants d'air chargés d'odeur. Au bout d'une minute on fait coulisser la partie amovible de la machine à test et on bloque ainsi leur sortie. Les mouches sont alors coincées dans les tubes où elles seront par la suite comptabilisées.

Le test se déroule dans le noir, afin que les mouches ne puissent pas être influencées par l'environnement extérieur qu'elles pourraient voir. Il se déroule dans une pièce hermétique à 25°C et 70% d'humidité, comme pour le conditionnement. Lors de cette phase, il est très important que la machine à test et les bouteilles soient bien équilibrées. Il faut alors s'assurer que les débits d'air provenant des bouteilles soient équivalents. Pour cela on diminue la pression que l'on impose, et seule la bouteille ayant le plus petit volume continue à buller car il y a moins de résistance. Une fois les débits examinés, il faut s'assurer que le système n'est pas biaisé. Pour cela on effectue un test en utilisant des mouches CS naïves, c'est-à-dire qui n'ont jamais rencontré l'une des deux odeurs. La répartition doit alors être la plus proche possible de 50/50. Si elles ont une préférence pour un côté, cela signifie qu'il faut diminuer le débit de l'odeur qu'elles ont fuie, et ce jusqu'à ce que l'on obtienne une distribution égale de chaque côté. Une fois cela vérifié, on peut faire le test sur nos mouches conditionnées.

6. Les autres phases de mémoire

Pour pouvoir tester la MCT ou la MRA, nous préparons les mouches de la même manière que pour la MLT. Les mouches sont placées la veille des conditionnements dans des bouteilles neuves et conservées une nuit à 18°C et 50% d'humidité.

Pour la MCT, les mouches subissent un seul cycle de conditionnement. Elles sont ensuite conservées dans la pièce de conditionnement pendant 2 heures, puis passent le test. Pour la MRA, les mouches subissent le cycle de conditionnement cinq fois de suite, et contrairement à la MLT, sans intervalle de 15 minutes. Les cinq cycles s'enchaînent les uns à la suite des autres, et le conditionnement ne dure pas 1h30 mais 30 min. Les mouches sont ensuite récupérées, puis transférées dans de nouvelles bouteilles et placées à 18°C avec 50% d'humidité. Le test se déroule ensuite 24 heures plus tard.

7. Importance des contrôles

Dans ce type de protocole, il est nécessaire de contrôler l'olfaction et la réactivité aux chocs électriques. En effet, une olfaction défaillante ou une insensibilité aux chocs pourrait être interprétées faussement comme un apprentissage défaillant.

Le contrôle de l'olfaction se fait en laissant des mouches naïves choisir entre une des deux odeurs ou un flux d'air pendant 1 minute. Les odeurs utilisées étant répulsives, les mouches ayant une olfaction normale choisiront le flux d'air. Mais ce protocole présente l'inconvénient que l'olfaction est testée sans chocs électriques. Or, la présence de stimuli aversifs et nocifs peut affecter certains aspects de la perception et de cette manière altérer les performances d'apprentissage et de mémoire (Préat 1998). Une nouvelle procédure de contrôle de l'olfaction a été mise au point après que les mouches aient été soumises à un choc électrique associé à une première odeur. Ensuite lors de la phase de test, la réactivité des mouches à la seconde odeur répulsive est évaluée (Préat 1998). Concrètement, les mouches subissent l'association d'une odeur avec les chocs électriques de la même manière que lors d'un conditionnement normal. Puis elles sont ensuite placées directement dans la machine à test où elles ont le choix pendant 1 minute entre un flux d'air et un flux chargé de la seconde odeur. Nous vérifions ainsi que les chocs électriques reçus ne perturbent pas l'olfaction pour la seconde odeur.

Pour contrôler la sensibilité aux chocs électriques, nous utilisons un appareillage particulier (figure 24). Deux barillets de conditionnement sont connectés l'un à l'autre par une