



HAL
open science

Etude de l'effet de la privation de sommeil sur la mémoire consolidée chez *Drosophila melanogaster*

Eric Le Glou

► **To cite this version:**

Eric Le Glou. Etude de l'effet de la privation de sommeil sur la mémoire consolidée chez *Drosophila melanogaster*. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66517 . tel-00832977

HAL Id: tel-00832977

<https://theses.hal.science/tel-00832977>

Submitted on 11 Jun 2013

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.

**THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI**

Spécialité : Neurosciences

École doctorale Cerveau-Cognition-Comportement (n°158)

Présentée par

M. LE GLOU Eric

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

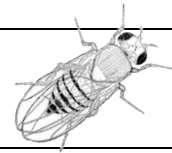
Sujet de la thèse :

**Etude de l'effet de la privation de sommeil sur
la mémoire consolidée chez *Drosophila melanogaster***

Soutenue le 5 juillet 2012 devant le jury composé de :

Pr Dominique HIGUET, Représentant de Paris VI
Dr François ROUYER, Rapporteur
Dr Frédéric MÉRY, Rapporteur
Dr Gaël MALLERET, Examineur
Dr Valérie GOGUEL, Directrice de thèse

REMERCIEMENTS



Je souhaite remercier en premier lieu Valérie qui m'a encadré au cours de ces 4 années. Maintenant que la thèse est finie, je peux dire que je ne regrette pas une seconde mon choix. Tu as su me "booster" parfois pour que le rythme ne faiblisse pas et j'ai énormément appris à tes côtés, en particulier sur l'organisation du travail (mon ancien point faible). Un grand merci pour ton investissement durant l'écriture de ma thèse. Pour finir sur une note ensoleillée, merci pour le Punch frais des Antilles.

Je remercie Thomas de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci pour ton dynamisme scientifique et pour avoir fait en sorte que ma fin de thèse se déroule dans de bonnes conditions. Enfin, merci de m'avoir permis de découvrir la mémoire, un domaine de recherche passionnant, surtout chez la droso.

Je souhaite remercier mes rapporteurs, François Rouyer et Frédéric Méry pour avoir lu et critiqué mon travail de thèse, ainsi que mes examinateurs, Gaël Malleret venu de Lyon pour se pencher sur ce petit insecte et Dominique Higuët, qui a toujours été disponible pour me conseiller pendant ces années où il était mon professeur de génétique des populations.

Je remercie aussi Laurent, celui qui m'a fait découvrir le monde du grand bleu, le sommeil. Un autre sujet passionnant (surtout chez la droso ;) que j'aimerais approfondir, et pourquoi pas revenir à Lyon après mon post-doc... Merci d'avoir été toujours présent pour discuter de ce projet et pour ta contribution à l'écriture du papier.

Le fruit d'un travail de thèse est aussi lié aux personnes extérieures, celles qui ont été présentes avant le début de mon doctorat mais aussi celles qui m'ont accompagné pendant ces 4 ans...

Je souhaite donc remercier tout ceux qui m'ont donné goût à la science car j'ai pu la découvrir à travers le prisme de la passion: M. Chenevot, mon professeur de physique-chimie au collège (et aussi entraîneur de basket à l'ESS) et ma tante Christiane, professeur de biologie aux connaissances intarissables sur les insectes et les plantes, toujours prête à sortir sa loupe de poche!

Je remercie aussi Eric Bonnivard qui m'a encadré durant mon premier stage en laboratoire et qui m'a fait découvrir "le monde de la recherche universitaire" (j'espère y revenir un jour).

Un grand merci aux non-scientifiques qui m'ont accompagné pendant ma thèse, ma famille et bien sûr mes parents qui m'ont encouragé à étudier la biologie à l'université, en sachant que ce n'était pas la filière où les diplômés trouvent du travail facilement.

Merci à Etienne et à mes amis du théâtre de la Compagnie de l'Instant, qui m'ont permis de déconnecter mon cerveau tous les mardi soir et surtout de bien rigoler.

Je remercie aussi les anciens collègues de fac que je vois malheureusement moins qu'avant, Flo & Stéph, Mougli & Rayane, Armelle & Bérangère. Et bien sûr merci à la petite Raphou, ma "psychologue de bar" ;)

Je remercie aussi les petites mains du laboratoire qui préparent tout ce dont nous avons besoin pour pouvoir travailler dans de bonnes conditions: Marcel, Michel, Annie, Nadou, Daniela, Marine et Léna.

Je remercie chaleureusement les membres de notre laboratoire: Paul, Sylvie, Aurélie, Céline, ainsi que les anciens: Nicolas pour notre amour d'Oxmo et Niki pour ton humour "so British" et ton accueil chaleureux à Boston.

Et enfin les camarades du JDB®: Mon Meilleur Jack et son grain de folie qui vous donne le sourire en toute occasion; Karine et sa twingo taxi (n'oublie pas de suivre le métro aérien); Julien Colomb & son salon (le Requin); le surfeur Rabi Kottler. Puis merci à Quentin pour ton oreille attentive et pour l' "esprit du cerf", à Julien mon prof de Bab qui ne m'a rien transmis ;), à Guigui et sa bonne humeur à toute épreuve, à la GRANDE Marlène et sa petite Harpe, à Séverine et son livarot, à Pipoux et son crinclin magique qui fait des tablettes de chocolat, à notre gendarmette favorite Clémence, à notre toulousain PYM (attention à l'excès de Redbull), à notre couple de thésards gifleurs incontrôlables Gigi l'africain & Za l'informaticienne-troubadour, à Emna et ses charavanes en-enflammées, à Anne et nos parties de billard au Hurling, à Delphine et son amour des ragots et bien sûr (last but not least) à mon colloc adoré Alexander Platz et ses vivarium qui m'ont bien fait triper. Merci à VOUS tous pour toutes ces soirées, tous ces films, et tous ces voyages pendant lesquels on a bien profité de la vie...

Qui dit jeudi, dit "je dis bière" ...

Et évidemment, un grand merci à ma Lili pour tout ce que tu sais... ;)

RESUME

Etude de l'effet de la privation de sommeil sur la mémoire consolidée chez *Drosophila melanogaster*

S'il est de plus en plus évident que le sommeil joue un rôle crucial dans la consolidation de la mémoire, nous ne connaissons toujours pas le rôle exact joué par le sommeil lors de ce processus. L'objectif de ma thèse a été de mieux comprendre les interactions sommeil/mémoire. Pour cela, nous avons choisi d'étudier chez la drosophile l'effet de courtes privations de sommeil sur la consolidation de la mémoire aversive olfactive.

Nous avons utilisé un protocole de conditionnement pavlovien qui permet aux drosophiles d'associer une odeur à des chocs électriques. En fonction du conditionnement qui est réalisé, deux types de mémoires consolidées peuvent être formées: la Mémoire Résistante à l'Anesthésie (MRA) et la Mémoire à Long Terme (MLT). Contrairement à la MRA, la MLT dont la formation est dépendante d'une néo synthèse protéique est coûteuse en énergie.

Les résultats obtenus démontrent que MRA et MLT sont toutes deux affectées par de courtes privation de sommeil, mais qu'elles deviennent insensibles à de telles privations si le test mnésique est réalisé en fin de journée. Ces résultats mettent à jour : i) une interaction fonctionnelle entre les étapes de consolidation et de rappel mnésiques, et ii) l'influence de facteurs circadiens sur la sensibilité de la mémoire aux privations de sommeil. De plus, mes résultats montrent qu'une privation de sommeil ayant lieu juste après le conditionnement exerce un effet bénéfique sur la consolidation de la mémoire.

Ce travail met donc en évidence la corrélation complexe qui existe entre le rythme circadien, le sommeil, et les étapes de consolidation et de rappel des mémoires consolidées.

Mots clés: privation de sommeil, rappel mnésique, mémoire olfactive consolidée, rythme circadien, pic d'activité, Drosophile, mutant de rythme circadien, DSCAM.

ABSTRACT

Effects of sleep deprivation on memory consolidation in *Drosophila*

If it is now widely accepted that sleep is important for memory consolidation, we do not know the exact role of sleep in this process. The purpose of my thesis project was to dissect the relationship between sleep and memory. To do so, we have analyzed the impact of short sleep deprivations on olfactory memory consolidation in *Drosophila*.

In flies, a conditioning session, consisting of an odor associated with electric shocks, induces associative olfactory memory. A massed conditioning generates a consolidated memory form called Anesthesia Resistant Memory (ARM), whereas a spaced conditioning, with rest intervals, induces Long-Term Memory (LTM). ARM and LTM can both last for days but, importantly, unlike ARM, LTM is an energetically costly memory that depends on *de novo* protein synthesis.

My results show that sleep deprivations affect LTM and, more unexpectedly, also ARM. This effect can be compensated at the step of memory retrieval if flies are tested just before lights-off, a period associated to an increase in fly locomotor activity. These results highlight: i) a functional interaction between the consolidation and the memory retrieval steps, and ii) that circadian factors influence the memory sensibility to sleep loss. Lastly, we have also shown that a sleep deprivation taking place right after conditioning, not only does not impair memory, but exerts a positive effect on memory consolidation.

This work points to complex correlations between circadian rhythms, sleep, and the retrieval step of consolidated memories in *Drosophila*.

Key words: *Drosophila*, Sleep deprivation, memory retrieval, consolidation of olfactory memory, circadian rhythm, activity peak, circadian mutant, DSCAM.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Résumé	7
Abstract	9
Table des matières	11
Table des figures	15
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
Introduction	25
A. Le modèle <i>drosophila melanogaster</i>	27
1. Les avantages de la drosophile	27
2. Anatomie du cerveau	28
3. Un modèle pour l'étude du comportement	32
4. Les outils de base	34
B. La mémoire	41
1. Introduction générale	41
2. Les différents paradigmes de mémoire chez la drosophile	42
3. Les différents types de mémoires	45
4. Le centre de la mémoire olfactive: les Corps Pédonculés	48
5. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la mémoire.....	52
C. Le sommeil	59
1. Introduction générale	59
2. Le sommeil chez la drosophile	61
3. Les corps pédonculés: centre de contrôle du sommeil	62
4. Les différents mécanismes impliqués dans le sommeil et la mémoire.....	63
5. Effet de la réduction du sommeil sur l'apprentissage et la mémoire	65
D. Le rôle du rythme circadien sur la mémoire	67
Matériels & Méthodes	69
1. Stock de drosophiles	69

2. Expression de l'ARNi (système UAS ^{GAL4} - Gene-Switch)	70
3. Conditionnement aversif olfactif.....	71
4. Analyse du sommeil	75
5. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc	75
6. PCR Quantitative (PCR-Q) en temps réel	75
7. PCR (« polymerase chain reaction »).....	77
8. Imagerie calcique <i>in-vivo</i> de la réponse aux odeurs	77
PARTIE I: Le rappel des memoires consolidees apres privation de sommeil est module par le rythme circadien	81
1. Introduction	81
2. Principaux Résultats	82
3. Conclusions	109
4. Résultats additifs à l'article.....	109
PARTIE II: Effet d'une privation de sommeil juste apres le conditionnement	115
1. La privation de sommeil juste après le conditionnement n'affecte pas la formation de la mémoire résistante à l'anesthésie	115
2. La privation à t ₀ n'affecte pas la formation de la mémoire à long terme	117
3. Une privation de 8 h à t ₀ n'affecte pas les mémoires consolidées	117
4. La privation de sommeil à t ₀ ne modifie pas la qualité de la mémoire formée	119
5. Une privation de sommeil à t ₀ a un effet positif sur la consolidation.....	122
6. La privation de sommeil à t ₀ n'altère pas le "reversal learning"	125
Discussion et perspectives	129
1. Effet du rythme circadien sur le rappel de la mémoire après une privation de sommeil	130
2. La consolidation de la mémoire des mutants de rythme circadien est insensible à une privation de sommeil.	134
3. Effet sur la mémoire d'une privation de sommeil juste après le conditionnement.....	136
4. Conclusion générale	139
Annexe: DSCAM	141
1. Brève introduction	141
2. Résultats	143
3. Conclusions	151
Bibliographie.....	155

TABLE DES FIGURES

Figure 1	: Schéma du cerveau de la drosophile.....	29
Figure 2	: Schéma des Corps Pédonculés et des lobes antennaires.....	30
Figure 3	: Courbe du sommeil des drosophiles sauvages élevées à 18°C ou à 25°C.....	33
Figure 4	: Représentation schématique des neurones de l'horloge.....	34
Figure 5	: Schéma du système binaire Gal4/UAS ^{GAL4}	35
Figure 6	: Schéma des différents systèmes permettant le contrôle temporel de l'expression d'un transgène.....	37
Figure 7	: Schéma du système shibire ^{ts1}	38
Figure 8	: Schéma du paradigme olfactif aversif.....	44
Figure 9	: Calcul de l'indice de performance.....	45
Figure 10	: La mémoire formée après 1 cycle de conditionnement est composé de MCT et de MRA. 45	
Figure 11	: Courbes de perdurance des différentes mémoires.....	46
Figure 12	: Schémas des 2 modèles des phases de mémoire.....	47
Figure 13	: Modèle des traces de mnésique après un conditionnement olfactif aversif.....	50
Figure 14	: Schéma des phases de sommeil chez l'Homme.....	60
Figure 15	: Schéma du système trikinetics.....	61
Figure 16	: Schéma des croisements pour "outcrosser" l'élément-P.....	70
Figure 17	: Une privation de sommeil de 4 h affecte la MLT lorsque le test a lieu à ZT6.....	110
Figure 18	: La privation de sommeil n'affecte pas la MLT chez des drosophiles arythmiques.....	110
Figure 19	: La MRA n'est pas affectée par l'expression de la sonde GCaMP3 dans les MB-V2.....	112
Figure 20	: Moyenne des réponses calciques 24 h après 5 cycles massés.....	112
Figure 21	: Une privation de sommeil à t ₀ n'a pas d'effet sur la consolidation de la MRA.....	116
Figure 22	: Une privation de sommeil à t ₀ n'a pas d'effet sur la consolidation de la MLT.....	117
Figure 23	: Une privation de sommeil de 8 h à t ₀ n'affecte pas la consolidation de la MRA et la MLT. 118	

Figure 24	: Effet d'une privation de sommeil à t_0 sur la consolidation de la MRA.....	120
Figure 25	: La privation de sommeil à t_0 ne modifie pas la stabilité de la MRA formée.....	120
Figure 26	: Effet d'une privation de sommeil à t_0 sur la consolidation de la mémoire résistante à l'anesthésie.....	121
Figure 27	: Une privation de sommeil de 4 h à t_0 n'affecte pas la consolidation de la MRA chez le mutant gal^{2805}	122
Figure 28	: Schéma récapitulatif n°1.....	123
Figure 29	: Schéma récapitulatif n°2.....	123
Figure 30	: La privation de sommeil à t_0 exerce un effet positif sur la consolidation de la MRA....	124
Figure 31	: La privation de sommeil à t_0 n'affecte pas le "reversal learning".....	126
Figure 32	: Résumé des résultats de la partie I et II.....	127
Figure 33	: Schéma de la structure de <i>dscam</i>	142
Figure 34	: Etude de la MLT avec le pilote d'expression <i>Elav-Switch</i>	144
Figure 35	: Etude de la MLT avec le pilote d'expression <i>MB-Switch</i>	144
Figure 36	: Contrôles de l'évitement des chocs électriques, et de l'olfaction.....	145
Figure 37	: L'inhibition de l'expression de <i>dscam</i> dans les CPs ne provoque pas de défauts de MRA ou de MCT.....	146
Figure 38	: L'induction des ARNi-3115 ou ARNi-D3-5 ne provoque pas de défaut de MLT.....	147
Figure 39	: Schéma des constructions miARN.....	148
Figure 40	: L'induction du miARN-17.1(9) ou miARN-17.2(9) dans les CPs ne provoque pas de défaut de MLT.....	150
Figure 41	: L'induction des miARN_1-8F ou miARN_2-3M ne provoque pas de défaut de MLT..	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Liste des oligonucléotides utilisés pour <i>dscam</i>	76
Tableau 2	: Liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier les différents allèles de <i>period</i>	77
Tableau 3	: Récapitulatif des résultats de PCR-quantitative.....	149

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc: acide deoxyribonucléique complémentaire	EMS: méthane sulfonate d'éthyl
AKAP: "A-kinase anchoring protein"	Fmr1: "fragile X mental retardation"
ala: "alpha-lobes absent"	GABA: acide gamma-aminobutyrique
AMN: amnesiac	GFP: "green fluorescent protein"
AMPC: adénosine monophosphate cyclique	GPCR: récepteurs couplés aux protéines G
ANOVA: "analysis of variance"	IP: indice de performance
aPKC: protéine kinase C atypique	LNd: "dorsal lateral neuron"
aPKM: protéine kinase M atypique	LNv: "ventral lateral neuron"
APL: "Anterior Paired Lateral"	MAPK: "mitogen-activated protein kinase"
ARN: acide ribonucléique	MB-V2: "mushroom bodies-V2"
ARN: acide ribonucléique	MCH: 4-méthyl cyclohexanol
ARNi: ARN interférent	MCT: mémoire à court terme
ARNm: acide ribonucléique messenger	miARN: micro ARN
BDNF: "brain derived neurotrophic factor"	MLT: mémoire à long terme
BRP : bruchpilot	MMT: mémoire à moyen terme
CaMKII: "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II"	MRA: mémoire résistante à l'anesthésie
ChR2: Channelrhodopsine 2	MSA: mémoire sensible à l'anesthésie
CPs: corps pédonculés	neur: neuralized
CREB: "cAMP reponse element binding"	nf1: "neurofibromatosis type 1"
CS-: stimulus non-conditionné	NMDA: "N-methyl-D-aspartic acid"
CS: canton-special	NS: non significatif
CS+: stimulus conditionné apparié	OCT: 3-octanol
DAL: "dorsal anterior lateral"	PCR: "Polymérase chain reaction"
DNC: dunce	PDF: "pigment dispersing factor"
DopR: récepteur à la dopamine	per: period
DPM: "dorsal paired medial"	perS: periodshort
DSCAM: "Down Syndrome Cell Adhesion Molecule"	PKA: protéine kinase AMPc dépendante
dTrpA1: "transient receptor potential A1"	PKI: inhibiteur de la protéine kinase
EcR: récepteur de l'ecdysone	PN: neurones de projections
	qPCR: PCR quantitative
	RDL: "resistance to dieldrin"

REM: "rapid eye movement"

RSH: radish

RT-qPCR: "quantitative Real Time
Polymerase Chain Reaction"

RU486: mifépristone

RUT: rutabaga

SEM: somme des écarts à la moyenne

SHI: shibire

SNAP: "sleep nulifying apparatus"

SWS: "slow wave sleep"

UAS: "upstream activating sequence"

US: stimulus non conditionné

ZT: zeitgeber

INTRODUCTION

Notre laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années aux mécanismes moléculaires et aux réseaux de neurones qui sous-tendent la mémoire chez la drosophile. Si des liens entre la mémoire et le sommeil ont été établis, le rôle du sommeil lors des processus de mémorisation est encore largement inconnu. Le sommeil reste l'un des derniers mystères des neurosciences. Pourquoi toutes les espèces étudiées à ce jour ont-elles besoin de dormir? L'une des principales hypothèses pour expliquer le rôle du sommeil est qu'il permettrait de réorganiser les connections synaptiques créées pendant la période d'éveil (Bushey *et al.*, 2011). Ainsi, seules les synapses pertinentes, par exemple celles formées pendant un apprentissage, seraient conservées et renforcées. De telles étapes de sélection semblent effectivement nécessaires car le cerveau ne peut former une infinité de connections synaptiques.

La mémoire peut être décomposée en trois phases principales : apprentissage, consolidation et rappel mnésique. Le sommeil favoriserait l'étape de consolidation, tandis que l'encodage et le rappel mnésique auraient lieu plus efficacement pendant les périodes d'éveil. La consolidation est un processus qui transforme les nouveaux souvenirs encore labiles en une représentation stable capable de s'intégrer dans le réseau préexistant des souvenirs à long terme. Or, la consolidation implique le retraitement actif des nouveaux souvenirs au sein des réseaux neuronaux qui ont été utilisés pour les coder. Cette étape semble donc être incompatible avec le traitement des *stimuli* au niveau du cerveau pendant l'éveil, ce qui

pourrait expliquer la caractéristique principale du sommeil qui est la perte de conscience réversible. Ainsi l'encodage et la consolidation ne se perturbent pas, de telle sorte que le cerveau n'ait pas l'impression « d'halluciner » pendant la phase de consolidation (McClelland *et al.*, 1995). Des recherches récentes dans ce domaine ont fourni des renseignements importants (qui seront développés dans l'introduction) sur les mécanismes au travers desquels le sommeil permet la consolidation de la mémoire.

Mon projet de thèse principal a consisté en l'étude du rôle du sommeil pendant l'étape de consolidation de la mémoire olfactive chez la drosophile. Le sommeil est-il nécessaire pour l'établissement des différentes formes de mémoire consolidée qui ont été décrites chez la drosophile? Quelle est la fenêtre de sensibilité des mémoires à une privation de sommeil après le conditionnement? Ce sommeil est-il nécessaire, comme chez les mammifères, pour le transfert des mémoires entre différentes régions du cerveau? Ce travail est la poursuite du projet initié par Laurent Seugnet, ancien post-doctorant du laboratoire.

Comme nous le verrons à travers l'Introduction de ce manuscrit, la drosophile, utilisée depuis plus de 30 ans pour l'étude de la mémoire, et depuis une 10^{aine} d'année pour l'étude du sommeil, est un bon modèle pour l'analyse des relations entre sommeil et mémoire. Mon travail de thèse sera ensuite présenté en deux parties. La première partie présentera l'article accepté pour publication dans le journal *SLEEP*. Dans cette étude, nous avons démontré que les deux types de mémoire consolidée qui existent chez la drosophile sont sensibles à une privation de sommeil, et que cette vulnérabilité dépend du moment de la journée pendant lequel le test de mémoire est effectué. Puis, dans la seconde partie, je présenterai des résultats non publiés sur l'effet d'une privation de sommeil juste après le conditionnement, privation qui provoque des conséquences assez inattendues. Enfin, l'annexe concerne l'étude du rôle de la protéine "*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*" (DSCAM) dans les processus mnésique. Ce projet n'est pas traité dans l'introduction.

A. Le modèle *drosophila melanogaster*

1. Les avantages de la drosophile

L'étude de modèles insectes a permis de faire de grandes découvertes dans de nombreux domaines des Sciences du Vivant. Par exemple, l'étude de la drosophile fut initiée en 1910 par l'américain Thomas Morgan qui reçut le Prix Nobel en 1933. Partant de l'isolement de drosophiles mutantes pour la couleur des yeux, Morgan et ses collaborateurs ont développé des outils génétiques qui leur ont permis d'établir les premières cartes génétiques et de proposer la théorie chromosomique de l'hérédité.

On s'était rendu compte à l'époque que l'irradiation aux rayons X ou l'administration par la nourriture d'agents mutagènes chimiques, induisaient des anomalies du développement. Ces recherches ont été révolutionnées dans les années 1970-80 par l'avènement des méthodes de la biologie moléculaire qui ont permis pour la première fois d'identifier les gènes mutés et de réaliser par la suite des études fonctionnelles. Ceci a conduit à développer chez la drosophile la méthode des cribles génétiques dont les résultats sont inestimables pour la biologie. Rappelons que les drosophiles sont de petite taille, à courte durée de génération, et faciles à élever en masse à faible coût.

La première grande percée biologique basée sur ces approches chez la drosophile fut le déchiffrement des mécanismes moléculaires du développement qui mènent de l'œuf fécondé à un organisme multicellulaire complexe. Cependant, les méthodes biochimiques ne permettaient pas d'identifier les facteurs qui contrôlent ces processus. C'est vers 1980 en Allemagne que Christiane Nüsslein-Volhart et Erich Wieschaus mirent en route des cribles de mutagenèse chez la drosophile dans le but d'identifier génétiquement les facteurs responsables du développement. Ces cribles ont été extrêmement fructueux et après quelques années, les biologistes ont commencé à comprendre les mécanismes moléculaires déterminant la mise en place des axes antéro-postérieur et dorso-ventral, la segmentation du corps, et la différenciation des structures spécialisées au sein de ces segments. De ces travaux a émergé

pour la première fois une image cohérente des processus génétiques, moléculaires et cellulaires qui concourent au développement d'un organisme multicellulaire. En très peu de temps, de nombreuses équipes à travers le monde ont montré que pratiquement tous les gènes impliqués au cours du développement de la drosophile possèdent des homologues chez les mammifères et chez l'Homme, et que ces gènes jouent des rôles semblables dans le développement de ces différents organismes. Ceci a mis en évidence la grande conservation au cours de l'évolution des molécules et des mécanismes qui contrôlent l'embryogenèse et la différenciation chez les organismes multicellulaires.

La liste des apports significatifs du modèle drosophile ne s'arrête pas à la génétique du développement. Ainsi les premiers gènes qui sous-tendent les rythmes jour/nuit chez les animaux ont été découverts chez la drosophile par Seymour Benzer (Konopka & Benzer, 1971). De tels gènes ont ensuite été rapidement identifiés chez la souris et chez l'Homme, et ce domaine de recherche est actuellement en pleine expansion. L'étude de la mémoire, du sommeil, de la nutrition, de l'immunité, et beaucoup d'autres, ont bénéficié et continuent de bénéficier du modèle drosophile. Le séquençage du génome de la drosophile, accompli en 2000, a révélé l'existence de 13.000 gènes, et on a depuis découvert que 75% des gènes humains récemment impliqués dans des pathologies humaines présentent des homologues chez l'insecte. La drosophile constitue en effet un modèle d'étude avantageux pour certaines pathologies, comme la maladie d'Alzheimer (Goguel *et al.*, 2011) ou celle de Parkinson (pour revue (Whitworth, 2011)). De façon intéressante, la plupart des voies de signalisation qui guident les processus basiques sont conservées des invertébrés aux vertébrés après plus de 700 millions d'années d'évolution (Rubin *et al.*, 2000). Enfin, d'un point de vue génétique, l'un des avantages de la drosophile par rapport aux modèles mammifères, est qu'il y a peu de redondance au niveau des gènes.

2. Anatomie du cerveau

Le cerveau de la drosophile, constitué d'environ 100.000 neurones, est fonctionnellement très structuré (Ito *et al.*, 2003). Le système nerveux périphérique de la drosophile possède différentes voies spécifiques à l'olfaction, la vision, la gustation et l'audition, qui projettent sur des structures spécifiques du système nerveux central. Le système nerveux central est divisé en deux grandes parties: la chaîne nerveuse ventrale comprenant les ganglions thoracique et abdominal, et le cerveau. Comme chez les autres insectes, les neurones sont unipolaires, avec les corps cellulaires massés à la périphérie du

cerveau tandis que les projections dendritiques et axonales sont regroupées dans la masse importante du neuropile. Le cerveau, composé de différents ganglions, est traversé par le tube digestif de manière antérograde. On distingue ainsi les ganglions supra- et sub-oesophagiens.

Le ganglion sub-oesophagien est le principal centre de traitement de la gustation. Ce système nerveux permet à la drosophile de détecter essentiellement la nature sucrée ou amère d'un aliment et sa concentration (Hiroi *et al.*, 2002; Thorne *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004b).

Le ganglion supra-oesophagien est composé de trois neuromères: le *protocerebrum*, le *deutocerebrum* et le *tritocerebrum*.

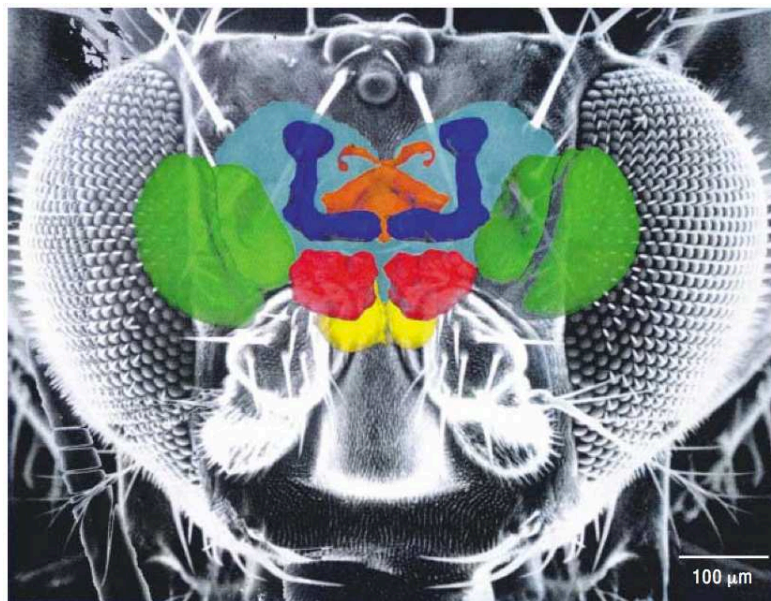


Figure 1 : Schéma du cerveau de la drosophile.

Les différentes structures du cerveau sont représentées en couleurs. En vert, les lobes optiques; en jaune, les ganglions sous-oesophagiens; en rouge, les lobes antennaires; en bleu, les corps pédonculés; en orange, le complexe central; en turquoise, le reste du neuropile entourant les corps pédonculés et le complexe central. (Heisenberg, 2003)

Le *protocerebrum*, le plus important par sa taille et sa complexité, regroupe quatre grandes structures : les deux lobes optiques, le complexe central, la *pars intercerebralis* et les Corps Pédonculés (CPs) (Figure 1).

- les lobes optiques, situés de part et d'autre du cerveau, traitent les informations visuelles provenant des yeux.

- le complexe central est localisé dans la partie centrale du cerveau. Il est composé du pont protocérébral, du corps en éventail ("fan shaped body"), de deux nodules et du corps en ellipse. Il reçoit essentiellement des informations sur l'activité locomotrice, provenant de la totalité du cerveau.

- la *pars intercerebralis*, située dans la partie antérieure du cerveau, est composée de neurones sécréteurs qui envoient des projections vers le ganglion tritocérébral (Strausfeld *et al.*, 1998) et vers la partie ventrale et le thorax, notamment au niveau des *corpora cardiaca* et *allata*, organe neuro-endocrine du thorax impliqué dans diverses fonctions comme la mue.

- les CPs (Figure 2) sont des structures situées de part et d'autre de l'axe de symétrie du cerveau et séparées du reste du neuropile par une fine couche de cellules gliales. C'est une structure importante du cerveau mais non vitale (Heisenberg *et al.*, 1985). Les CPs sont connus pour être impliqués dans le traitement supérieur des signaux olfactifs, dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (conditionnements olfactifs: pour revue, voir (Waddell & Quinn, 2001; Wolf *et al.*, 1998), comportement de cour: (McBride *et al.*, 1999)), dans la phase initiale des comportements adaptatifs complexes de choix (Tang & Guo, 2001; Zhang *et al.*, 2007), et dans la régulation du sommeil (Joiner *et al.*, 2006; Pitman *et al.*, 2006). C'est pourquoi nous allons décrire cette structure en détail.

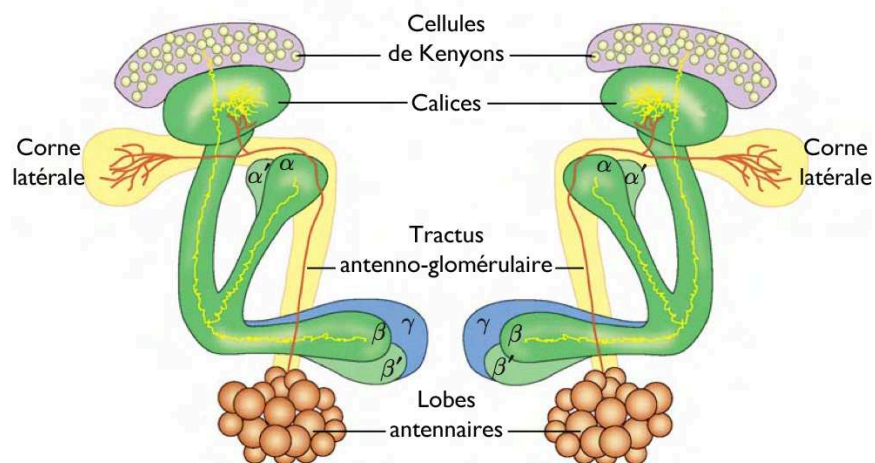


Figure 2 : Schéma des Corps Pédonculés et des lobes antennaires.

Les neurones de projection partent des lobes antennaires en formant le tractus antenno-glomérulaire et projettent au niveau de la corne latérale et des dendrites des cellules de Kenyon, les calices. Chaque CP est composé de 2 000 neurones, les cellules de Kenyon. Trois types de cellules de Kenyon projettent leur axone dans cinq lobes différents : α/α' , β/β' et γ . (Adaptée de Isabel & Preat, 2008)

Chaque CP est composé d'environ 2.000 neurones dits intrinsèques, appelés cellules de Kenyon, et de neurones dits extrinsèques, afférents ou efférents (Ito *et al.*, 1998). Les corps cellulaires des cellules de Kenyon, situés dans la partie dorsale postérieure de chaque hémisphère, projettent leurs dendrites dans les calices, structures volumineuses et arrondies situées en dessous des corps cellulaires (Figure 2). Ces dendrites reçoivent des afférences olfactives provenant des lobes antennaires (par le tractus antenno-glomérulaire), et peut-être

des afférences d'autres modalités sensorielles (Stocker *et al.*, 1990). Les axones des cellules de Kenyon projettent de manière fasciculée pour former le pédoncule qui se termine au niveau dorsal des lobes antennaires. A cet endroit, les axones se divisent pour former différents lobes: trois lobes horizontaux (β , β' et γ), et deux lobes verticaux (α et α') (Crittenden *et al.*, 1998). Il existe 3 types de cellules de Kenyon, celles dont l'axone bifurque pour projeter au niveau des lobes α et β , celles dont l'axone bifurque pour projeter au niveau des lobes α' et β' , et enfin, celles dont l'axone ne bifurque pas et projette au niveau du lobe γ . Les lobes reçoivent de nombreux neurones afférents provenant du neuropile, pouvant répondre à plusieurs modalités sensorielles (pour revue, voir (Ito *et al.*, 1998)). Les neurones efférents des CPs ne renverraient pas les informations directement vers les zones motrices, mais pourraient soit les connecter *via* plusieurs interneurons soit *via* les autres centres de traitement du protocerebrum antérieur (Ito *et al.*, 1998) .

Le *deutocerebrum* est composé principalement des lobes antennaires, centre de traitement de l'olfaction. L'olfaction est assurée par deux organes principaux: les antennes et les palpes maxillaires. Les neurones olfactifs projettent *via* les nerfs antennaires ou le nerf labial sur les glomérules des lobes antennaires. Les neurones efférents des lobes antennaires projettent vers le protocerebrum, au niveau des CPs et de la corne latérale (Ito *et al.*, 1998) (Figure 2). Les CPs assureraient l'intégration des stimuli olfactifs avec d'autres modalités sensorielles (mémoire olfactive) et la corne latérale assurerait le comportement d'évitement des odeurs aversives (Ito *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003). La corne latérale reçoit les informations olfactives *via* les neurones de projection et est impliquée dans l'évitement inné des odeurs répulsives (Wang *et al.*, 2003). Ainsi, chez la drosophile, deux voies olfactives convergent sur la corne latérale: une voie innée d'évitement aux odeurs qui va directement des lobes antennaires vers la corne latérale, et une voie qui provient des CPs et dont le signal est modulé par l'apprentissage.

Le deutocerebrum comporte également les principales voies effectrices motrices du comportement (« posterior slope ») (pour revue, (Ito *et al.*, 1998)).

Enfin le *tritocérébrum* se compose de deux lobes relativement petits et bilatéraux à la base du cerveau. La composition du tritocerebrum est encore mal définie, mais il serait nécessaire afin d'établir des relations sensorimotrices entre le proboscis et la région digestive (nerfs stomatogastriques).

3. Un modèle pour l'étude du comportement

Malgré la relative simplicité de son cerveau (10^5 neurones contre 10^9 chez l'Homme), la drosophile est capable de produire une variété de comportements complexes que l'on peut étudier en laboratoire. Par exemple, le comportement de cour (ou parade sexuelle), le vol, les réflexes moteurs, l'apprentissage, l'addiction aux drogues, les rythmes circadiens, l'agressivité ou le sommeil. Il est important de noter que nombre de ces comportements sont régulés par l'horloge circadienne interne. Ainsi, il est connu que l'horloge circadienne influe sur la ponte (T *et al.*, 2008), l'éclosion (l'émergence des drosophiles de leur pupes se fait préférentiellement le matin) (Konopka & Benzer, 1971), la modulation de la sensibilité aux odeurs (Krishnan *et al.*, 1999), la gustation (Chatterjee *et al.*, 2010) la parade sexuelle et l'apprentissage (Lyons & Roman, 2009).

La présence d'une horloge circadienne dans tous les organismes, des bactéries aux mammifères, souligne son rôle fondamental dans la survie des espèces. Cette horloge permet à l'organisme d'adapter au mieux sa physiologie et ses comportements aux variations de sa niche écologique (lumière, température, présence de nourriture et de partenaire sexuel) (Takahashi *et al.*, 2008).

Les rythmes circadiens sont définis par trois propriétés principales : **(i)** ils sont entraînés par des synchroniseurs ("zeitgebers", indices sur l'heure de la journée), tels que les changements de lumière et de température (Levine *et al.*, 2002). Ceci permet de calibrer les neurones de l'horloge par rapport à l'environnement. **(ii)** Ils persistent dans des conditions constantes (obscurité constante), ce qui indique la présence d'une horloge autonome. **(iii)** L'horloge est rythmée sur un cycle d'environ 24 h (*circa* = proche, *dia* = jour). Sur la base de ces propriétés, les systèmes circadiens sont organisés en trois parties principales: l'horloge interne de base qui maintient la période (le temps); les voies d'entrée, qui synchronisent l'horloge avec l'environnement, et les voies de sortie, qui transmettent l'information pour organiser le comportement et la physiologie en fonction du temps.

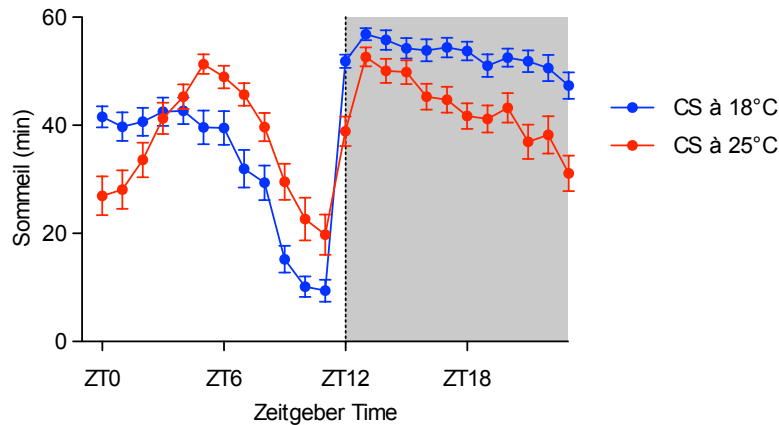


Figure 3 : Courbe du sommeil des drosophiles sauvages élevées à 18°C ou à 25°C.

Réprésentation du sommeil des drosophiles sauvages en fonction de l'heure de la journée (ZT0 = 8 am). En bleu: les drosophiles élevées à 18°C n'anticipent pas l'allumage des lumières mais elles dorment moins en fin de journée (ZT9 = 17 h). En rouge: les drosophiles élevées à 25°C dorment moins le matin et le soir, elles anticipent les changements de phases. (Le Glou *et al.*, 2012)

Les animaux peuvent être classés suivant leur période d'activité, nocturne, diurne ou crépusculaire. La drosophile fait partie de cette dernière catégorie car, lorsqu'elle est élevée à 25°C, elle présente 2 pics d'activité locomotrice au cours de la journée, un le matin et un le soir (Figure 3). Des températures plus faibles inhibent le pic d'activité du matin, qui est ainsi moins important, voire absent, à 18°C (Figure 3) (Zhang *et al.*, 2010). On compte chez la drosophile environ 80 neurones par hémisphère impliqués dans l'horloge et qui sont divisés en plusieurs groupes en fonction de leur localisation dorsale ou ventrale (Figure 4) (Chang, 2006; Shafer *et al.*, 2006). Les neurones latéraux qui expriment le "*pigment dispersing factor*" (PDF) sont impliqués dans l'induction du pic d'activité du matin (les "*ventral lateral neuron*" LNV) alors que ceux qui n'expriment pas PDF sont impliqués dans le pic d'activité du soir (les "*dorsal lateral neuron*" LND) (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004).

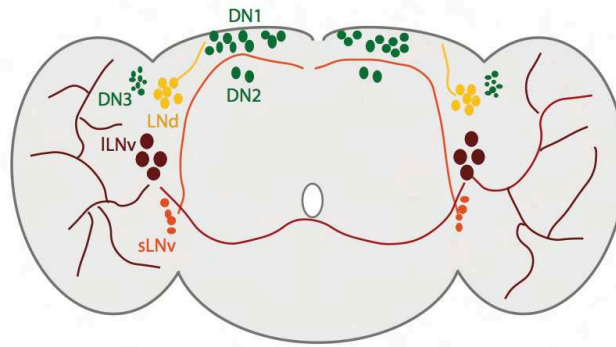


Figure 4 : Représentation schématique des neurones de l'horloge.

Les sLNv envoient des projections dorsalement (orange), les ILNv projettent au niveau des lobes optiques et contra-latéralement (marron). Les LNd sont indiqués en jaune et les DN en vert. (Allada & Chung, 2009)

4. Les outils de base

En plus d'un système nerveux et d'un génome relativement simples, de nombreux outils génétiques ont été développés avec succès chez la drosophile.

Les premiers mutants de mémoire olfactive identifiés ont été générés par des mutagénèses au méthane sulfonate d'éthyle (EMS) (Dudai *et al.*, 1976; Quinn *et al.*, 1979), un agent qui produit des mutations aléatoires ponctuelles. L'avantage de cette technique de mutagénèse est qu'elle permet d'affecter un gène de manière spécifique, contrairement aux délétions qui recouvrent de larges zones du génome, et ainsi de corrélérer de manière précise une mutation à un phénotype donné. Néanmoins, les mutations ainsi générées sont difficilement traçables, et il est souvent compliqué d'identifier le gène affecté par cette mutation.

Les transposons

Les transposons (présents naturellement chez différentes espèces) sont des séquences d'ADN mobiles capables de se déplacer dans le génome hôte. Ces éléments transposent directement sous forme d'ADN grâce à la transposase. Ils possèdent, à chacune de leurs extrémités, un enchaînement identique d'une trentaine de nucléotides, mais en ordre inversé, formant deux séquences en miroir reconnues par la transposase. L'un de ces transposons, l'élément-P, a été génétiquement modifié de telle sorte qu'il n'est plus capable de se déplacer de façon autonome. La séquence codant la transposase a été remplacée par des séquences codant un marqueur phénotypique qui permet de contrôler l'efficacité d'intégration de cet élément, ainsi qu'un transgène d'intérêt (la séquence sauvage ou mutée d'un gène, une séquence ARNi...). En général, l'insertion de cet élément-P modifié se fait de façon aléatoire

dans le génome, et peut ainsi être utilisé pour réaliser des mutagénèses. En effet, le plus souvent son insertion provoque un défaut d'expression du gène dans lequel il s'est intégré. Il existe aussi un système d'intégration de ces éléments-P modifiés qui est site-spécifique et qui n'affecte pas l'expression des gènes situés à proximité.

Cet outil a été adapté pour plusieurs problématiques :

- les techniques d'identification de séquences régulatrices: « enhanceur trap ».

Si l'élément-P contient le gène LacZ ou celui de la GFP par exemple, il peut servir pour les mutagénèses tout en permettant la détection du patron d'expression du gène muté. En effet, l'expression de la GFP devient dépendante des régions régulatrices du gène dans lequel l'élément-P s'est inséré. Plusieurs mutants de mémoire ont ainsi été identifiés, en criblant des mutants présentant une expression préférentielle dans les CPs, le centre de la mémoire olfactive (Dura *et al.*, 1993; Skoulakis & Davis, 1996).

- contrôle spatial de l'expression d'un transgène.

A l'aide du système binaire Gal4/UAS^{GAL4}, système d'activation de la transcription issu de la levure, il est possible de contrôler spatialement l'expression d'un gène situé dans un élément-P. Un premier élément-P permet l'expression de la protéine Gal4 sous le contrôle de séquences régulatrices spécifiques de régions ou types cellulaires d'intérêts (pilote d'expression), tandis qu'un second élément-P contient un gène d'intérêt situé en aval des séquences régulatrices reconnues spécifiquement par la protéine Gal4 (UAS^{GAL4}). Le transgène d'intérêt sera donc exprimé dans les neurones où Gal4 est exprimée.

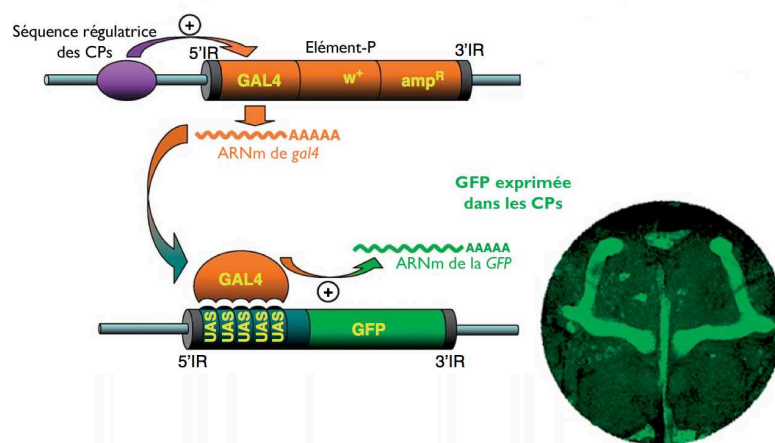


Figure 5 : Schéma du système binaire Gal4/UAS^{GAL4}.

Lorsqu'un élément transposable est inséré près de séquences régulatrices, le gène *Gal4* contenu dans l'élément-P est exprimé en fonction de ces séquences régulatrices. Si la drosophile contient également un gène rapporteur (par exemple la GFP) en aval de la séquence UAS^{GAL4}, la protéine GAL4 va activer la transcription du rapporteur. GFP, green fluorescent protein; ARNm, acide ribonucléique messenger. (Adapté de Isabel & Preat, 2008)

- contrôle spatio-temporel de l'expression d'un transgène.

Dans le but de restreindre l'expression du transgène au moment choisi par l'expérimentateur, plusieurs systèmes inductibles ont été développés.

(1) **le système Gal80^{ts}** : la protéine Gal80^{ts}, inhibiteur spécifique de Gal4, est thermosensible (elle change de conformation en fonction de la température) (Figure 6). Ainsi, à température restrictive (< 30°C), la protéine Gal80^{ts} se fixe sur la protéine Gal4, l'empêchant ainsi de reconnaître les séquences UAS^{GAL4}. Le gène placé en aval de l'UAS^{GAL4} n'est donc pas exprimé. A l'inverse, à température permissive (> 30°C), la protéine est dénaturée et ne peut plus interagir avec Gal4 qui pourra alors activer l'expression du gène placé en aval de l'UAS^{GAL4} (McGuire *et al.*, 2003).

(2) **le système Gene-Switch** : il code pour une protéine de fusion inactive: Gal4-Récepteur à la progestérone. La conformation de cette protéine et donc sa capacité à se fixer sur les séquences UAS^{GAL4} dépend de la présence de son ligand, le RU486 (Figure 6). Le gène en aval des séquences UAS^{GAL4} est exprimé uniquement lorsque les drosophiles ingèrent le RU486 présent dans leur nourriture (Mao *et al.*, 2004).

Le contrôle spatio-temporel de l'expression des transgènes est un outil puissant pour réaliser des études fonctionnelles.

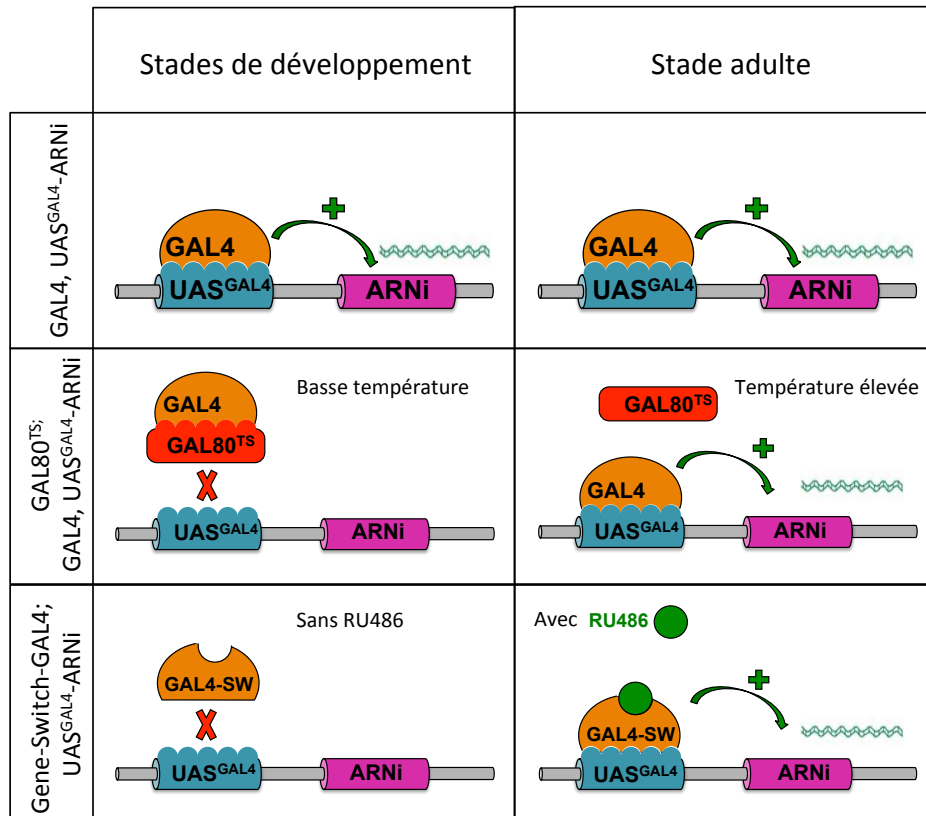


Figure 6 : Schéma des différents systèmes permettant le contrôle temporel de l'expression d'un transgène.

Une séquence codant un ARNi (ARN interférent) est placée sous contrôle d'une séquence UAS^{GAL4}. (A) Avec le système binaire GAL4/UAS^{GAL4}, l'expression du transgène n'est contrôlée que spatialement. L'expression de l'ARNi pendant le développement peut causer des défauts de mémoires qui sont dus à un développement anormal de certains neurones. (B) À basse température (20°C), la protéine GAL80^{TS} se fixe sur le GAL4, inhibant son activité transcriptionnelle. Lorsque les mouches adultes sont transférées à haute température (30°C), la protéine GAL80^{TS} change de conformation et ne peut plus se fixer au GAL4. L'activateur GAL4 peut activer la transcription des gènes en aval des séquences UAS^{GAL4}. (C) Avec le système Gene-Switch, en absence de RU486, la protéine de fusion GAL4-Switch est inactive. Lorsque la drogue est ajoutée au milieu de culture, elle se fixe sur la protéine de fusion GAL4-Switch et la protéine devient transcriptionnellement active. (Adapté de Isabel & Preat 2008)

Contrôle localisé de l'activité neuronale

Plusieurs transgènes permettant un contrôle de l'activité des neurones ont été développés chez la drosophile. Par exemple, la toxine tétanique TNT permet de bloquer la transmission synaptique en clivant la protéine Synaptobrevine qui est impliquée dans la libération des vésicules synaptiques. Ainsi, l'expression de cette toxine, médiée par l'un des systèmes Gal4/UAS^{GAL4}, permet un blocage spécifique de la neurotransmission des neurones d'intérêt (Sweeney *et al.*, 1995).

D'autres transgènes ont été développés afin de moduler plus précisément l'activité neuronale:

- Le gène *shibire* (*shi*) code une dynamine impliquée dans l'endocytose. Elle est essentielle pour le recyclage des vésicules synaptiques. Un allèle thermosensible de ce gène, *shi^{ts}* a été développé (Kitamoto, 2001). Cet allèle est dominant et bloque le recyclage des vésicules synaptiques à température restrictive (>29°C), entraînant un blocage rapide mais réversible de la transmission synaptique (Figure 7). L'utilisation d'un transgène UAS^{GAL4}-Shi^{ts} couplé à un pilote d'expression Gal4 spécifique de certains neurones permet donc d'inhiber leur activité pour une durée précise.

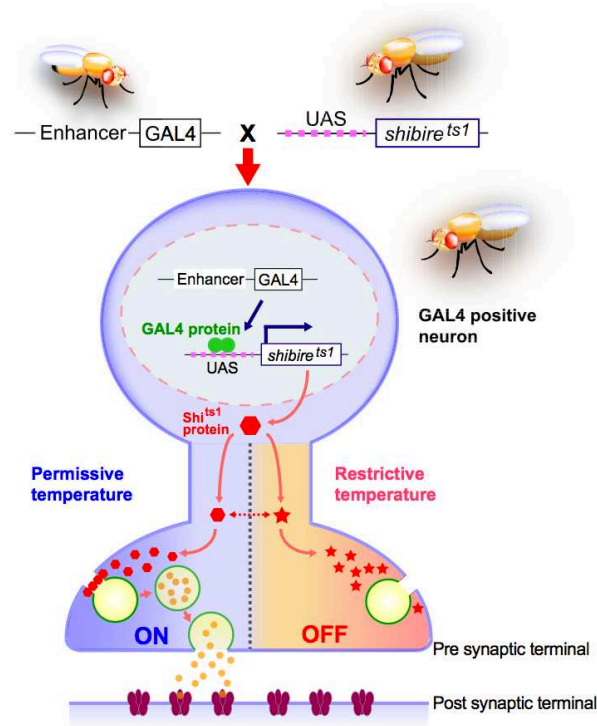


Figure 7 : Schéma du système *shibire^{ts1}*

A température permissive (20°C), la protéine SHI^{ts} est fonctionnelle et la neurotransmission se fait normalement. A température restrictive (> 29°C), le dominant négatif SHI^{ts} empêche le recyclage des vésicules synaptiques et induit un blocage de la transmission synaptique des neurones. (Kasuya *et al.*, 2009)

- Le gène de la **Channelrhodopsine 2 (ChR2)** code un canal transmembranaire sensible à la lumière. Ainsi, l'application d'un stimulus lumineux entraîne la dépolarisation et donc l'activation des neurones exprimant ChR2 (Boyden *et al.*, 2005; Nagel *et al.*, 2005).

- Le gène « **transient receptor potential A1** » (**dTrpA1**), code un canal ionique thermosensible qui induit la dépolarisation des neurones lorsque la température est supérieure à 30°C. A température restrictive (<30°C), les neurones fonctionnent normalement, et à température permissive (>30°C), les neurones sont activés (Hamada *et al.*, 2008 ; Parisky *et al.*, 2008).

Imagerie *in vivo*

L'un des inconvénients majeurs dans l'étude du fonctionnement du cerveau de la drosophile est que les corps cellulaires des neurones sont de petite taille (moins de 5 μm). Il est ainsi difficile de réaliser des études d'électrophysiologie afin de déterminer la séquence et les niveaux d'activation des neurones au cours du temps. Néanmoins, des mesures indirectes de l'activité neuronale sont possibles à l'aide de sondes ratiométriques. Plusieurs sondes de ce type ont été mises au point, permettant **(i)** de visualiser les changements de la concentration intracellulaire en calcium : UAS^{GAL4}-GCaMP (Nakai *et al.*, 2001), UAS^{GAL4}-TN-XL (Mank *et al.*, 2006), UAS^{GAL4}-cameleon 2.1 (Miyawaki *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001), **(ii)** de mesurer des variations de pH indiquant une libération de neurotransmetteurs: UAS^{GAL4}-SpH (Miesenbock *et al.*, 1998), et **(iii)**, de mesurer directement l'activité kinase d'une protéine comme la PKA avec la sonde AKAR (Zhang *et al.*, 2001).

B. La mémoire

1. Introduction générale

La compréhension de la biologie de la mémoire reste l'une des grandes quêtes des neurosciences. Comme nous l'avons mentionné plus haut, le processus de mémorisation peut se décomposer en trois grandes étapes: l'apprentissage, la consolidation et le rappel.

Il existe suivant les espèces, différents types de mémoire qui peuvent être définis en fonction de la durabilité des souvenirs. Chez l'homme, on distingue ainsi la mémoire à court terme (MCT, ou mémoire de travail) qui permet de se souvenir d'informations pendant quelques minutes, et la mémoire à long terme (MLT) qui conserve durablement les informations pendant plusieurs jours voire toute la vie. Cette dernière est subdivisée en 4 formes qui sont la mémoire épisodique, la mémoire sémantique, la mémoire perceptive et la mémoire procédurale. Selon la théorie dominante, la consolidation de la MLT se déroule pendant le sommeil (Diekelmann & Born, 2010). Les souvenirs sont alors transférés de l'hippocampe vers le cortex. Ce transfert dépendrait d'ondes dites à front raide ("*sharp waves*") générées dans l'hippocampe, principalement pendant le sommeil lent (Buzsaki *et al.*, 1990).

Les formes élémentaires d'apprentissage et de mémoire ont été assez bien caractérisées depuis les travaux d'Ivan Pavlov et d'Edward Thorndike durant la première partie du 20^{ème} siècle. Ces travaux ont permis d'établir les concepts de base pour une étude plus approfondie au niveau cellulaire. Ainsi, les recherches menées avec une approche réductionniste radicale par Eric Kandel (Prix Nobel 2000) sur l'aplysie (*Aplysia californica*) ont permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes biochimiques impliqués lors de la formation de la mémoire. Ces travaux ont permis de déterminer que l'apprentissage repose sur la plasticité synaptique, c'est à dire, des changements fonctionnels d'efficacité de connections synaptiques.

La formation de la MCT semble s'accompagner de changements post-transcriptionnels, et plus particulièrement d'événements de phosphorylation qui modifient la fonction de protéines synaptiques. Ceci aura pour conséquence le renforcement temporaire de connections synaptiques déjà présentes dans les réseaux de neurones qui contrôlent le comportement.

L'identification de protéines impliquées dans la formation de la MLT laisse à penser qu'elle nécessite la modification de connections synaptiques de façon "permanente" (renforcée). Ainsi, le processus d'encodage requiert des récepteurs à des neurotransmetteurs (NMDA, DopR), des seconds messagers et leurs effecteurs (Ca^{2+} , Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase CaMKII, MAPK, PKA), et des facteurs de développement et de transcription (BDNF, CREB). Plusieurs de ces protéines sont impliquées dans la néo synthèse protéique qui semble donc être la marque des processus de consolidation de la MLT. De plus, cette synthèse protéique doit se faire dans les heures qui suivent la fin du conditionnement. En effet, une inhibition plus tardive de la synthèse protéique n'a aucun effet sur la consolidation (Sanes & Lichtman, 1999). Ces observations suggèrent que la maintenance des traces de mémoire ne se fait pas par une expression continue de ces molécules mais plutôt par le maintien des modifications morphologiques qui ont eu lieu pendant la consolidation (Kandel, 2001).

En conclusion, alors que la MCT semble nécessiter une modification de l'efficacité synaptique, la MLT semble dépendre de changements dans le nombre de ces synapses.

2. Les différents paradigmes de mémoire chez la drosophile

Chez la drosophile, les larves ainsi que les adultes présentent une remarquable complexité comportementale et il existe de nombreux paradigmes qui permettent l'étude de la mémoire. Il est ainsi possible d'étudier plusieurs types d'apprentissage: visuel, du comportement de cour, de l'orientation spatiale, de l'extension du proboscis, de la suppression de la phototaxie, de la mémoire olfactive appétitive et de la mémoire olfactive aversive (chocs électriques ou chocs mécaniques).

Lors d'un conditionnement de comportement de cour, un mâle sexuellement mature est placé avec une femelle déjà fécondée qui rejette donc ses tentatives de parade sexuelle. Au bout d'un certain nombre de rejets, les mâles apprennent à ne plus courtiser de femelles en général (Ackerman & Siegel, 1986; Ejima *et al.*, 2005). Un conditionnement court (1 h)

permet de générer de la MCT alors qu'un conditionnement long (5 h ou bien 3 fois 1 h séparé par des périodes d'isolation de 1 h) permet de générer de la MLT.

Les conditionnements olfactif appétitif et aversif sont des protocoles Pavlovien. Comme le chien de Pavlov qui apprend à associer le son de la cloche à la présentation de nourriture, les drosophiles à jeun apprennent lors d'un conditionnement appétitif à associer une odeur à la présence de sucre. Lors du test de mémoire, les drosophiles iront préférentiellement vers l'odeur qui était au préalable associée au sucre. A l'inverse, lors d'un conditionnement olfactif aversif (Quinn *et al.*, 1974), les drosophiles apprennent à associer une odeur à des chocs électriques. Ainsi, lors du test de mémoire, les drosophiles éviteront cette odeur.

a) *Le conditionnement olfactif*

Le conditionnement olfactif aversif fait partie des plus utilisés. Il a été mis en place dans le début des années 1970 par Seymour Benzer. En effet, Chip Quinn et Bill Harris réussirent à convertir Seymour Benzer pour qu'il transforme son emblématique appareil permettant de séparer les drosophiles en fonction de leur phototaxie en une machine pour étudier l'apprentissage. Cet appareil « rudimentaire » et manuel a permis l'isolement des premiers mutants d'apprentissage ce qui a mis en évidence l'importance de la voie de l'AMPC pour ce processus: *dunce* (*dnc* - qui code phosphodiesterase), *rutabaga* (*rut* - qui code adénylyl cyclase) et *amnesiac* (*amn*) (Dudai *et al.*, 1976 ; Livingstone *et al.*, 1984 ; Quinn *et al.*, 1979). Par la suite, le champ d'étude de la mémoire olfactive chez la drosophile a franchi une étape importante avec le développement d'un test de mémoire utilisant un T-maze (Tully & Quinn, 1985), puis celui du barillet de conditionnement (Pascual & Preat, 2001) (Figure 8-A). Ces avancées technologiques permettent de traiter en même temps plusieurs groupes d'individus et d'améliorer la reproductivité des expériences.

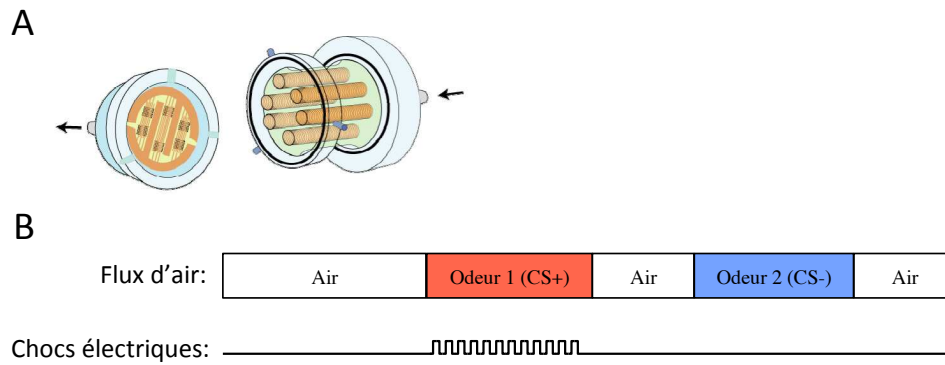


Figure 8 : Schéma du paradigme olfactif aversif

(A) Schéma du barillet utilisé pour le conditionnement. Chaque groupe de drosophiles est placé dans l'un des six trous du barillet. Chaque trou est entouré d'une grille en cuivre électrifiable et les odeurs sont diffusées à l'aide d'un système de pompe. (B) Principe du conditionnement aversif. Dans un premier temps, l'odeur 1 (CS+) est présentée aux drosophiles en présence de chocs électriques (US). Puis l'odeur 2 (CS-) est présentée sans choc électrique. ((A) Pasual & Preat 2001)

Le conditionnement et le test de mémoire sont effectués dans une pièce où l'environnement est contrôlé (température, humidité, sources lumineuses et qualité de l'air). Dans ce paradigme, une 30^{aine} de drosophiles sont piégées dans chacun des six trous du barillet. Chaque trou est recouvert d'une grille électrifiable, et les odeurs sont diffusées dans le barillet par un système de pompe (Figure 8-A).

Un cycle de conditionnement se décompose de la manière suivante : une première odeur aversive (le stimulus conditionné apparié ou CS+) est diffusée en association avec une série de chocs électriques (le stimulus non conditionné ou US), puis, après une courte période sans aucune stimulation, une seconde odeur aversive (le stimulus non-conditionné, CS-) est présentée sans chocs électriques (Figure 8-B).

Lors du test de mémoire on met les drosophiles conditionnées en position de choisir, en l'absence de chocs électriques, entre les deux odeurs ("T-maze"; Figure 9-A). Le test est réalisé dans le noir car les drosophiles sont naturellement attirées par la lumière (phototaxie). On calcule ensuite un score en fonction de la distribution des drosophiles observée après une minute en soustrayant le nombre de drosophiles du côté CS+ au nombre de drosophiles du côté CS-, divisé par le nombre total (Figure 9-B). Pour éviter tout biais vers l'une des odeurs, une population différente (du même génotype) est ensuite conditionnée en inversant le CS+ et le CS-. L'indice de performance (IP) correspond alors à la moyenne des scores des deux expériences réciproques. Une distribution de 50:50 conduit donc à un IP = 0 (pas de mémoire).

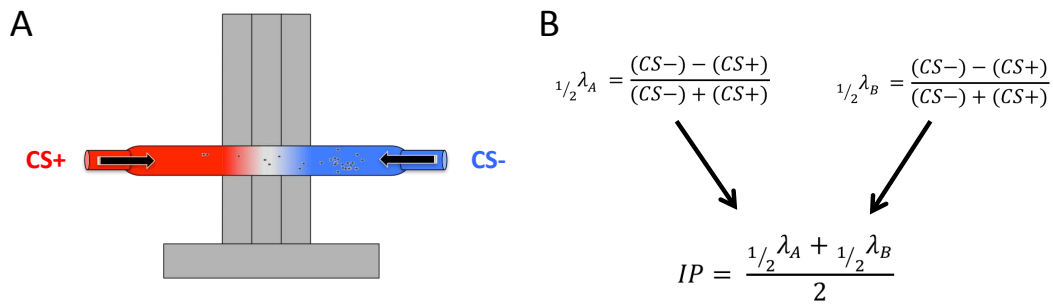


Figure 9 : Calcul de l'indice de performance.

(A) Schéma d'une machine de test. Pendant le test, les mouches sont placées à un point de convergence dans la machine en T où elles doivent choisir entre les deux odeurs. Les mouches sauvages ayant une bonne mémoire choisissent préférentiellement l'odeur CS-, non associée aux chocs électriques lors du conditionnement. (B) Equation pour calculer l'indice de performance (IP). Il correspond à la moyenne des deux expériences réciproques.

3. Les différents types de mémoires

Il existe chez la drosophile différentes formes de mémoire qui présentent des caractéristiques similaires à celles décrites chez les autres espèces (pour revue: (Davis, 2005)). Ainsi, la formation de ces différentes mémoires dépend du conditionnement olfactif aversif effectué (Tully *et al.*, 1994):

- 1 cycle de conditionnement engendre la formation d'une mémoire qui est mesurable pendant quelques heures. Cette mémoire est composée d'une partie labile qui est sensible à une anesthésie par le froid et d'une partie résistante à une telle anesthésie (mémoire résistante à l'anesthésie: MRA). La mémoire sensible à l'anesthésie correspond à la MCT entre 0 et 1 h et à la mémoire à moyen terme MMT entre 1 et 5 h après le conditionnement.

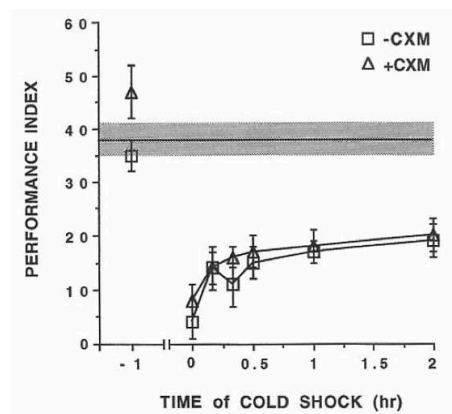


Figure 10 : La mémoire formée après 1 cycle de conditionnement est composée de MCT et de MRA.

L'indice de performance est calculé 3 h après 1 cycle de conditionnement. L'anesthésie par le froid à différents temps après le conditionnement diminue le score de mémoire (différence entre les carrés et la ligne grise). La consolidation de la MRA semble atteindre son maximum 2 h après le conditionnement. (Tully *et al.*, 1994)

- 5 cycles de conditionnement consécutifs (conditionnement massé) engendrent la formation de mémoire consolidée mesurable pendant plusieurs jours (Figure 11). Cette mémoire est essentiellement composée de MRA. Il a été démontré dans notre équipe qu'il existe un effet social lors du test de cette mémoire. En effet, le rappel est facilité lorsque les drosophiles sont testées en groupe (Chabaud *et al.*, 2009).

- 5 cycles de conditionnement espacés par des intervalles de repos de 15 minutes provoquent la formation de MLT qui est mesurable pendant plusieurs jours (Figure 11). Cette mémoire consolidée est elle aussi résistante à l'anesthésie par le froid, mais contrairement à la MRA, sa formation est sensible à la présence d'un inhibiteur de la traduction, indiquant qu'elle est dépendante d'une synthèse protéique *de novo* (Tully *et al.*, 1994).

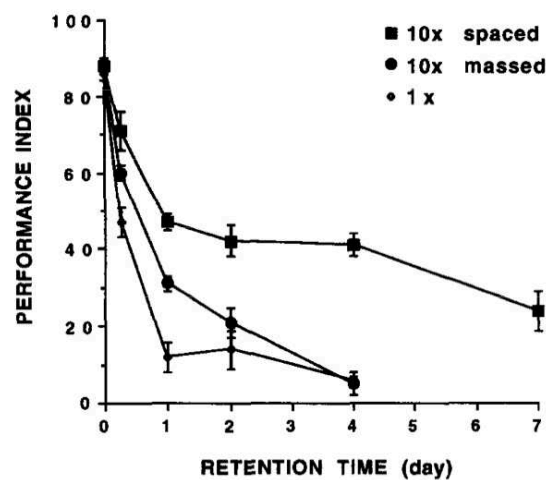


Figure 11 : Courbes de perdurance des différentes mémoires.

La MLT formée après un conditionnement espacé perdure pendant plusieurs jours. La MRA formée après un conditionnement massé décline plus rapidement que la MLT. La MCT décroît très rapidement après 1 cycle de conditionnement. (Tully *et al.*, 1994)

Le modèle classique de formation des différentes mémoires est linéaire. Selon ce modèle, la MCT serait initialement formée, puis elle se transformerait en MMT qui elle-même générerait *via* des processus de consolidation de la MLT et/ou de la MRA (Figure 12-A). Cependant, notre laboratoire a proposé un modèle où la formation des deux mémoires consolidées se fait en parallèle mais de manière indépendante (Figure 12-B). En effet, plusieurs résultats ont permis de proposer cette hypothèse: **(i)** la MCT n'est pas totalement effacée chez les mutants *rut* et *dnc*. Ceci suggère qu'il existe, en plus de la voie dépendante de l'AMPC (MCT_1), une voie indépendante (MCT_2). De plus, **(ii)** la MRA est normale chez les mutants *rut* et *amn* alors que la mémoire labile est fortement affectée. Donc la formation de la

MRA semble être indépendante de la voie qui conduit à la formation de la MCT₁ et de la MMT. Il y a donc deux voies parallèles d'apprentissage.

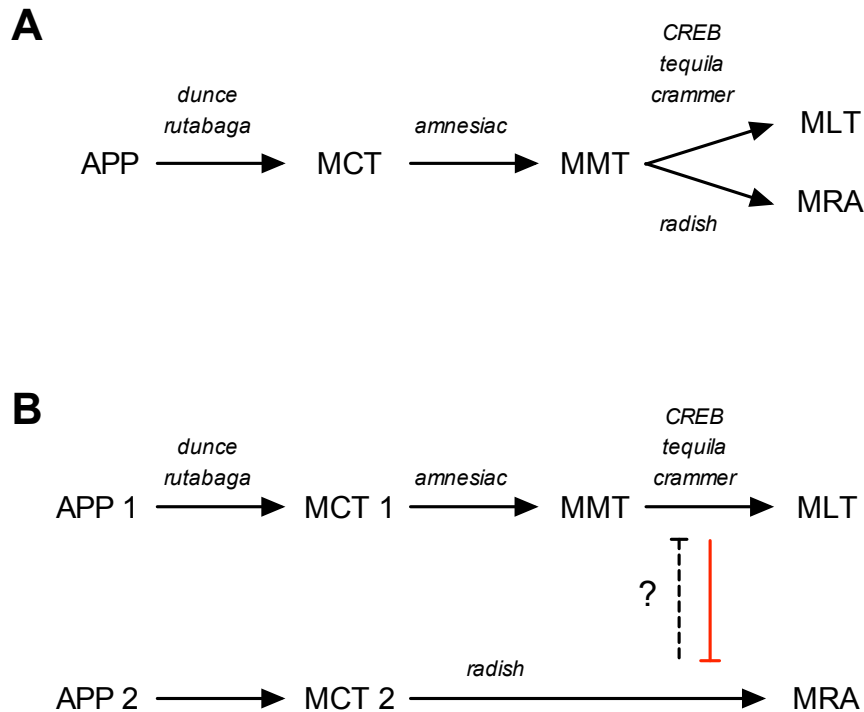


Figure 12 : Schémas des 2 modèles des phases de mémoire.

Dynamique des phases de mémoire formées après un conditionnement aversif olfactif. **(A)** Modèle classique: les produits des gènes *dunce*, *rutabaga*, *amnesiac* jouent un rôle dans la formation de la MCT et de la MMT par la régulation de la voie AMPc. Deux types de mémoire consolidées existent. La MLT, dépendante de la néo synthèse protéique est formée après un protocole espacé et requiert les produits des gènes *CREB*, *crammer* et *tequila*. La MRA est formée après les protocoles court, massé et long et requiert le produit du gène *radish*. La MRA et la MLT coexisteraient donc après un conditionnement long. (Adapté de Marguillies *et al.*, 2005) **(B)** Modèle alternatif: deux voies d'apprentissage parallèles sont distinguées. La première dépend de la voie AMPc. La seconde permet la formation de MRA et est indépendante de l'AMPc. Après un protocole espacé, la MLT efface la MRA et de manière réciproque, la MRA pourrait bloquer la formation de la MRA. (Adapté de Isabel *et al.*, 2004)

Pour ce qui est de la relation entre la MRA et la MLT, l'étude de drosophiles "*alpha-lobes absent*" (*ala*) dépourvues des lobes verticaux des CPs a été d'une grande aide. Les expériences réalisées avec ces mutants spécifiques de MLT suggèrent que les deux types de mémoire consolidée sont exclusifs (Isabel *et al.*, 2004). En effet, 5 h après 1 cycle de conditionnement, la MRA mesurée est normale, alors que 5 h après un conditionnement espacé, il n'y a quasiment plus de mémoire chez ces mutants. Ces résultats suggèrent donc que la formation de la MLT (suite à un conditionnement espacé) provoque l'effacement la MRA. Cette hypothèse a récemment été confirmée par une autre série d'expériences (Placais *et al.*,

2012). Dans cette étude, il a été démontré que les deux types de mémoire consolidée ne peuvent coexister, et que de plus, l'inhibition de la MRA conditionne la transformation des traces de mémoire précoce en MLT. La MRA permettrait ainsi de contrôler la formation de la MLT, une mémoire dont la formation est plus coûteuse en énergie (Mery & Kawecki, 2005).

4. Le centre de la mémoire olfactive: les Corps Pédonculés

Pendant longtemps la drosophile a principalement été considérée comme un excellent véhicule pour identifier les «gènes de la mémoire», puis l'avènement récent d'outils génétiques sophistiqués qui permettent de manipuler l'activité neuronale a ouvert la porte à l'étude des circuits neuronaux. Chez la drosophile, le centre de la mémoire olfactive est composé des cellules de Kenyon et également des neurones extrinsèques aux CPs qui jouent un rôle important durant la consolidation comme nous allons le décrire.

a) *Etude de mutants avec des défauts anatomiques*

L'implication des CPs dans la mémoire olfactive a été révélée par l'étude d'une collection de lignées mutantes avec divers défauts anatomiques au niveau du cerveau. Les drosophiles avec des CPs anormaux sont capables de sentir les odeurs et les chocs électriques, mais incapables d'associer ces *stimuli* (Heisenberg *et al.*, 1985). D'autres expériences comme l'ablation pharmacologique des CPs (avec de l'hydroxyurée) ont permis de confirmer cette hypothèse (de Belle & Heisenberg, 1994).

b) *Cheminement de l'information olfactive*

Les odeurs sont perçues par les neurones olfactifs situés au niveau des antennes et des palpes maxillaires. Ce sont les récepteurs olfactifs présents à la membrane de ces neurones qui sont sensibles aux molécules odorantes. Chaque neurone olfactif exprime l'un des 61 récepteurs olfactif présents chez la drosophile (dans de rares exceptions ils peuvent exprimer plusieurs récepteurs).

Les axones des neurones olfactifs projettent au niveau des lobes antennaires où l'information est transmise aux neurones de projection qui sont connectés aux CPs, et à la corne latérale (Figure 2). Cette dernière est impliquée dans la réponse « innée » aux odeurs aversives alors que les CPs jouent un rôle dans la voie de l'olfaction dépendante de l'expérience ainsi que dans la réponse aux odeurs attractives.

c) *Transmission de l'information des chocs électriques*

Plusieurs études ont démontré le rôle fondamental des neurones dopaminergiques, neurones extrinsèques aux CPs, pour la transmission de l'information des chocs électriques. Des expériences d'imagerie calcique ont permis de montrer que ce sont les neurones dopaminergiques projetant sur les CPs qui répondent fortement aux chocs électriques (Riemensperger *et al.*, 2005). Les expériences de blocage synaptique ont confirmé que l'activité de ces neurones est nécessaire lors du conditionnement aversif (Aso *et al.*, 2010; Schwaerzel *et al.*, 2003). Enfin, les récepteurs à la dopamine (dopR(=Dumb ou dDA1) et dopR2(=DAMB)) sont fortement exprimés dans les CPs (Han *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2003). Les drosophiles mutantes pour DopR présentent des défauts d'apprentissage de mémoire olfactive aversive bien que la réponse aux odeurs et la sensibilité aux chocs électriques soient normales (Kim *et al.*, 2007). Une étude récente a démontré que l'expression du récepteur au niveau des lobes γ est suffisante pour permettre la formation de la MCT et de la MLT (Qin *et al.*, 2012). A ce jour, aucun rôle n'a été démontré pour le récepteur DopR2 (DAMB) dans la formation de la mémoire.

d) *Le rôle des différents lobes*

Comme nous l'avons vu lors de la description des CPs, ceux-ci sont composés de plusieurs lobes posant la question de leurs rôles respectifs lors des processus de mémorisation. Cette question a été abordée par l'étude de drosophiles mutantes *ala* sans lobes verticaux (α et α'). De telles drosophiles sont spécifiquement affectées pour la MLT, établissant un lien fonctionnel entre le lobe α et la MLT (Pascual & Preat, 2001).

L'un des moyens les plus utiles pour comprendre le rôle des différents types de cellules de Kenyon dans la mémoire est de bloquer leur transmission synaptique à différentes périodes, en exprimant par exemple la protéine Shi^{ts}. Il a été ainsi mis en évidence le rôle des neurones α'/β' pendant l'apprentissage et la consolidation pour la mémoire à 3 h après 1 cycle de conditionnement (Krashes *et al.*, 2007). Pour la restitution de la MCT, la neurotransmission des neurones projetant leurs axones au niveau des lobes α , β et γ est requise (Dubnau *et al.*, 2001; Isabel *et al.*, 2004; Schwaerzel *et al.*, 2002). Enfin, le rappel des mémoires consolidées (MRA et MLT) nécessite la neurotransmission des neurones α/β (Isabel *et al.*, 2004).

Des analyses d'imagerie calcique ont permis de préciser l'idée que l'on a du rôle de chaque lobe dans les différentes mémoires (Figure 13). La présence d'une trace mnésique (réponse calcique plus élevée dans les neurones en réponse au CS+) est progressivement détectée dans les différents lobes après conditionnement. Ainsi, un conditionnement aversif olfactif génère une trace mnésique immédiate (3-6 min) au niveau du lobe antennaire, une région nécessaire pour la MCT (Yu *et al.*, 2004). Ensuite, des traces mnésiques intermédiaires (30 min à 1 h après le conditionnement) se produisent dans les neurones "Dorsal Paired Medial" DPM (neurones qui innervent les CPs, au niveau des lobes α et α') (Yu *et al.*, 2005) ainsi qu'au niveau des neurones α'/β' (Wang *et al.*, 2008). Après un conditionnement espacé, l'influx de calcium se produit dans les neurones α/β des CPs entre 3 et 9 h après le conditionnement, et persiste pendant 24 h (Yu *et al.*, 2006). Cette trace est absente si la synthèse protéique est bloquée (Yu *et al.*, 2006) et chez les mutants de MLT (Akmal *et al.*, 2011). Enfin, une seconde trace spécifique de la MLT apparaît dans les neurones γ plus de 24 h après le conditionnement (Akmal *et al.*, 2010). Aucune étude n'a analysée les traces mnésiques après un conditionnement massé.

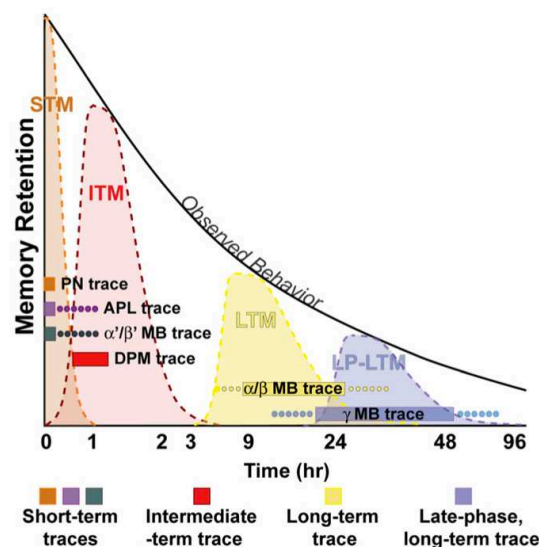


Figure 13 : Modèle des traces de mnésique après un conditionnement olfactif aversif.

Différents groupes de neurones supportent la mémoire à différents temps après le conditionnement. Entre 0 et 1 h après l'apprentissage, une trace est détectée dans les neurones de projections (PN), les neurones APL et dans les neurones α'/β' . La mémoire intermédiaire (ITM) est associée à une trace mnésique dans les neurones DPM (1 à 2 h après le conditionnement). Enfin, la mémoire à long terme est associée à une trace mnésique dans les neurones α/β puis après 24 h dans les neurones γ . (Davis, 2011)

Par conséquent, les neurones α/β , α'/β' et γ sont fonctionnellement distincts, et les sous-ensembles neuronaux des CPs sont séquentiellement impliqués dans la formation, la consolidation et le rappel des différentes mémoires (Krashes *et al.*, 2007). Les CPs constituent donc une partie essentielle du réseau neuronal nécessaire pour la formation et le rappel de la mémoire.

Il est probable que l'exposition à une odeur suscite une réponse comportementale chez la drosophile qui dépend de l'intégration entre la voie des CPs et celle de la corne latérale. Si la drosophile est naïve par rapport à l'odeur, c'est la voie de la corne latérale qui indiquera quel comportement il faut adopter. Si la drosophile a eu une expérience préalable significative avec l'odeur, c'est la voie des CPs qui peut prédominer.

La constatation que de nombreux gènes liés à la mémoire sont fortement exprimés dans les CPs conduit à l'hypothèse qu'ils jouent un rôle dans la mémoire au niveau des CPs. Cependant, la plupart de ces gènes sont également exprimés dans d'autres régions cérébrales et, dans la majorité des cas, l'importance de l'expression au niveau des CPs dans la mémoire n'a pas été formellement adressée. En fait, une première étude a suggéré que l'expression de *dnc* en dehors des CPs est importante pour la MCT, alors que l'expression dans les CPs est nécessaire pour les mémoires consolidées (Qiu & Davis, 1993). Récemment, il a été montré que la synthèse protéique *de novo* n'est pas nécessaire dans les CPs pour la mise en place de la MLT (Chen *et al.*, 2012). Cette neo synthèse protéique serait nécessaire dans les deux neurones "dorsal-anterior-lateral" (DAL) (neurones qui sont connectés au niveau des calices aux neurones α/β des CPs). De plus, ces neurones joueraient aussi un rôle pendant le rappel de la MLT car leur blocage provoque un défaut spécifique de MLT.

e) *Le rôle des neurones extrinsèques*

Pour ce qui est des neurones extrinsèques, notons (en plus de celui des neurones dopaminergiques) le rôle des 2 neurones DPM qui projettent leurs axones sur les CPs. Chaque axone se sépare en deux, un neurite projette sur les lobes verticaux (α et α') et l'autre sur les lobes horizontaux (β , β' et γ). Les DPM sont impliqués dans un premier temps pour la formation de la MMT *via* la libération du peptide amnesiac sur les lobes α' et β' . Le récepteur n'a pas été identifié, mais des études biochimiques laissent penser que le peptide amnesiac pourrait moduler l'activité de l'adénylyl cyclase *rut*, et donc la quantité d'AMPC présent dans la cellule. Dans un second temps, la formation de la MRA nécessite la libération de sérotonine des DPM sur les lobes α et β (Lee *et al.*, 2011). L'activation du récepteur 5HT1A au niveau

de ces neurones provoque la diminution de la concentration en AMPc, et l'activation des phospholipases C. Ceci aura donc pour conséquence de réduire l'activité de la PKA.

Les neurones "Anterior Paired Lateral" APL ont aussi été identifiés comme jouant un rôle dans l'apprentissage. Ces neurones sont GABAergiques et la réduction de la synthèse du GABA de ces neurones provoque une augmentation de l'apprentissage. Les neurones APL semblent donc libérer du GABA pour inhiber l'apprentissage au niveau des récepteurs RDL des CPs (Liu & Davis, 2009).

Récemment, une équipe a mis en évidence la présence de jonctions communicantes (gap-junction) entre les DPM et les APL. Ils ont démontré que ces jonctions hétérotypiques permettraient de synchroniser ces neurones ce qui favoriserait la formation de la MSA (Wu *et al.*, 2011).

5. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la mémoire

L'objectif de cette partie est de décrire les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation des différentes mémoires.

a) La mémoire à court terme

La cascade AMPc/PKA

Des cribles réalisés pour identifier des mutants d'apprentissage et de mémoire ont mis à jour deux composants de la voie de l'AMPc : le gène *dnc* qui code une phosphodiesterase (Byers *et al.*, 1981; Dudai *et al.*, 1976), et le gène *rut*, qui code une adénylyl cyclase (dépendante du Ca²⁺/calmoduline) (Levin *et al.*, 1992; Livingstone *et al.*, 1984). En accord avec les études sur les mutants anatomiques, il a été démontré que ces deux protéines sont préférentiellement exprimées au niveau des CPs (Han *et al.*, 1992; Nighorn *et al.*, 1991). Rutabaga pourrait jouer le rôle de détecteur de coïncidence (Gervasi *et al.*, 2010) entre l'odeur et les chocs électriques en étant activée spécifiquement dans un nombre limité de cellules de Kenyon par des vagues de Ca²⁺ suivant la dépolarisation des neurones de projection (information du CS+) et la fixation de monoamines (information de l'US) sur les récepteurs couplés aux protéines G. Chez un mutant *rut*, l'expression sélective du gène *rutabaga* dans les lobes α , β et γ des CPs à l'âge adulte, restaure la mémoire à un niveau sauvage (Mao *et al.*, 2004; McGuire *et al.*, 2003; Zars *et al.*, 2000).

Plusieurs autres gènes dont la fonction est située en amont de celle de la PKA ont été impliqués dans la formation de la mémoire: *nfl* (Ho *et al.*, 2007); une sous-unité de la protéine-G de type $S\alpha$ (Connolly *et al.*, 1996) et *nebula/ sarah* (un inhibiteur de la calcineurine) (Chang *et al.*, 2003).

Le système GABAergique est lui aussi impliqué dans la formation de la mémoire. La diminution de l'expression du récepteur GABA_A Rdl augmente la mémoire alors qu'à l'inverse, la sur-expression de ce récepteur induit des défauts de mémoire. Rdl dans les CPs semble inhiber l'apprentissage en modulant les entrées des informations olfactives (Liu *et al.*, 2007). Un lien entre le récepteur Rdl et la voie de l'AMPc a été établi car l'absence du récepteur ne permet pas d'améliorer la mémoire chez le mutant *rut*. Ceci suggère que rutabaga agit en aval du récepteur GABA_A (Liu *et al.*, 2009).

La PKA est une protéine tétramérique composée de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. Elle est préférentiellement exprimée dans les CPs (Crittenden *et al.*, 1998 ; Skoulakis *et al.*, 1993). Lorsque la concentration d'AMPc augmente dans la cellule, celui-ci se fixe sur les sous-unités régulatrices qui relarguent alors les sous-unités catalytiques, leur permettant ainsi de phosphoryler leurs cibles. L'induction d'un inhibiteur de la protéine kinase (PKI) une heure avant le conditionnement induit un défaut d'apprentissage (Drain *et al.*, 1991). Un crible de lignées exprimant Gal4 dans les CPs a permis d'identifier des allèles mutants du gène Pka-C1 (DCO) codant pour la sous-unité catalytique de la PKA. Une réduction de 80% de l'expression de DCO entraîne un sévère défaut d'apprentissage (Li *et al.*, 1996; Skoulakis *et al.*, 1993). Enfin, une dernière étude a permis de déterminer que la sous-unité régulatrice de type I (Pka-R1) est exprimée dans les corps cellulaires des CPs et que des mutants de cette sous-unité présentent des défauts d'apprentissage (Goodwin *et al.*, 1997).

Voie indépendante de la cascade AMPc/PKA:

La protéine hétérotrimérique G(o) est activée par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et participe à de nombreuses voies de signalisation cellulaire. L'inhibition de cette voie de signalisation dans les CPs de mouches adultes entraîne un défaut de mémoire immédiate (Ferris *et al.*, 2006). Le défaut de mémoire observé est plus important dans un contexte *rut*, suggérant que la voie d'apprentissage de G(o) serait indépendante de la voie AMPc. La fonction de cette protéine pendant l'apprentissage reste encore à déterminer, mais elle pourrait inhiber les canaux Ca²⁺ voltage-dépendant, restreignant ainsi la libération synaptique à certains neurones des CPs (Ikeda, 1996).

L'inhibition de l'activité de la protéine Rac (famille rho-GTPase) provoque une augmentation de la mémoire. A l'inverse, une augmentation d'activité engendre un déclin de la mémoire plus rapide. Cette protéine, qui agit entre autres sur la régulation du cytosquelette, serait donc impliquée dans l'effacement de la mémoire (Shuai *et al.*, 2010).

Ces résultats montrent que les voies moléculaires impliquées dans l'apprentissage seraient plus nombreuses et plus complexes que ce que l'on a cru pendant longtemps.

b) La mémoire résistante à l'anesthésie

Chez le mutant *radish* (*rsh*), la mémoire résiduelle après 1 cycle de conditionnement est effacée par une anesthésie par le froid (Folkers *et al.*, 1993). Ainsi, la protéine codée par le gène *rsh* est requise pour la consolidation de la MRA. Cette protéine est très fortement exprimée dans les CPs, suggérant que la formation de la MRA a lieu dans les CPs (Folkers *et al.*, 2006). Si la fonction moléculaire de la protéine RSH reste inconnue à ce jour, on peut noter qu'elle présente un site de liaison avec la protéine RAC1 et de nombreux sites de phosphorylation par la PKC et la PKA. Ainsi, la PKA pourrait également jouer un rôle dans la consolidation de la MRA.

En effet, il a été découvert qu'une réduction de 50% de l'activité de la PKA chez des mutants hétérozygotes DCO/+ entraîne une augmentation de la mémoire entre 3 à 5 heures après conditionnement (Horiuchi *et al.*, 2008). Cette augmentation de mémoire perdure après application d'un choc par le froid, suggérant que cette extra-mémoire est de la MRA. Par ailleurs, l'expression d'une PKA sauvage dans les CPs inhibe la formation de cette extra-mémoire chez un mutant hétérozygote DCO/+ (Horiuchi *et al.*, 2008). Ces résultats ne contredisent pas nécessairement ceux obtenus sur le rôle de la PKA pendant l'apprentissage car il faut atteindre une forte chute d'activité de la PKA (80%) pour observer un défaut d'apprentissage (Li *et al.*, 1996; Skoulakis *et al.*, 1993). Ainsi, la PKA jouerait un rôle inhibiteur dans la formation de la MRA en plus de son rôle positif pour la formation des MCT et MMT.

La protéine kinase M atypique (aPKM) est une isoforme tronquée et constitutivement active de la protéine kinase C atypique (aPKC). L'expression de cette aPKM après conditionnement augmente la mémoire après un protocole massé, alors que son inactivation la diminue. Chez le mutant *radish*, la surexpression de l'aPKM permet d'augmenter la MRA (Drier *et al.*, 2002). Ainsi, l'aPKM jouerait un rôle dans la formation et la consolidation de la

MRA indépendamment ou en aval de RSH. Néanmoins, les mécanismes et les lieux d'action de l'aPKM restent inconnus à ce jour.

Il est intéressant de noter aussi le rôle de 2 protéines présynaptiques impliquées dans le relargage vésiculaire, la synapsine et bruchpilot (BRP). La protéine synapsine est impliquée dans la MSA (Knappek *et al.*, 2010) alors que BRP est préférentiellement requise pour la MRA (Knappek *et al.*, 2011).

Enfin, la sérotonine joue un rôle dans la formation de la MRA. Celle-ci est améliorée si le taux de sérotonine est artificiellement augmenté. A l'inverse, une diminution du taux de sérotonine inhibe la formation de la MRA (Lee *et al.*, 2011). La sérotonine impliquée dans la formation de la mémoire est libérée par les neurones DPM qui projettent sur les CPs.

c) La mémoire à long terme

Régulation de la transcription

Peu d'études ont démontré un rôle direct de la PKA dans la MLT chez la drosophile. Néanmoins, des travaux ont montré le rôle d'une protéine d'ancrage à la PKA "A-kinase anchoring protein" (AKAP) dans la formation de la MLT. L'AKAP Yu est une protéine capable de fixer la PKA, restreignant ainsi son activité à un sous-domaine cellulaire. Elle est exprimée fortement dans les lobes α' et β' des CPs, et le mutant *yu* présente un défaut spécifique de MLT. L'expression d'un transgène *yu*⁺ dans les CPs d'une drosophile adulte, sauve la perte de MLT observée dans le mutant *yu* (Lu *et al.*, 2007), suggérant un rôle physiologique de cette AKAP, et montrant ainsi l'importance de la localisation subcellulaire de la PKA dans la formation de la MLT.

La PKA serait capable d'activer des facteurs de transcription de la famille Creb, en réponse à une augmentation d'AMPC (Bacskai *et al.*, 1993). Le gène *creb2* est un gène complexe codant au moins sept isoformes différentes dont la forme dCreb2-a, activatrice, et la forme dCreb2-b, répresseur de la transcription (Yin *et al.*, 1995). L'activation de la transcription de certains gènes par CREB est requise pour l'élaboration de la MLT (Perazzona *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 1994). Ainsi, la protéine CREB jouerait un rôle important dans la formation de la MLT *via* son rôle d'activateur de la transcription. Néanmoins il reste encore à déterminer s'il existe des isoformes activatrices capables d'augmenter la MLT.

L'étude du gène *Notch* a permis de confirmer l'importance de la régulation de la transcription pour la formation de la MLT. Le gène *Notch* code un récepteur transmembranaire. En réponse à la fixation de ligands sur sa partie extracellulaire tels que

Delta, la protéine Notch est clivée, et la partie cytoplasmique est adressée au noyau pour activer la transcription de gènes cibles (Kidd *et al.*, 1998; Schroeter, 1998 #2444; Struhl & Adachi, 1998). L'inactivation de Notch dans les CPs adultes entraîne un défaut spécifique de MLT (Presente *et al.*, 2004). A l'inverse, la sur-expression de Notch chez l'adulte permet aux drosophiles de former de la MLT après seulement 2 cycles de conditionnement (Ge *et al.*, 2004).

Un partenaire potentiel de Notch jouant un rôle dans la formation de la MLT a été identifié. Le gène *neuralized (neur)* code une ubiquitine ligase E3, nécessaire pour la régulation de Notch pendant la neurogenèse. Le mutant hétérozygote *neur* présente un défaut de MLT spécifique et la sur-expression de *neur*⁺ dans les neurones périphériques des lobes α et β augmente la MLT (Pavlopoulos *et al.*, 2008). Ces résultats confirment l'importance de la voie Notch dans la formation de la MLT.

Régulation traductionnelle et post-traductionnelle

À l'aide d'un crible comportemental et d'une étude de puces à ADN, plusieurs protéines impliquées dans la localisation des ARNm et dans la traduction ont été décrites comme jouant un rôle dans la formation de la MLT (Dubnau *et al.*, 2003):

- Pumilio, un répresseur de la traduction dont le rôle dans la régulation de la traduction localement dans les oocytes a été démontré.
- Staufen et Oskar, impliqués dans la translocation de ribonucléoprotéines-eIF-5, un facteur d'initiation de la transcription. Ces protéines sont exprimées majoritairement dans les CPs, et des mutants de ces protéines présentent tous des défauts de MLT. Ces différents résultats montrent que la formation de la MLT requiert une régulation de la traduction des ARNm localement, soit au niveau des calices post-synaptiques, soit dans les lobes pré-synaptiques.

Une autre étude a montré l'importance de la régulation de la synthèse protéique, et notamment de la voie de la kinase II calmoduline-dépendante (CamKII), impliquée dans la plasticité synaptique chez les mammifères pour la formation de la MLT (Kelleher *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que la formation de MLT requiert un adressage précis de cette protéine au niveau post-synaptique dans les neurones de projection.

Plusieurs gènes ayant un rôle potentiel dans la régulation de la stabilité des protéines ou dans le niveau d'expression des protéines nécessaires pour la MLT ont été identifiés: Crammer (protéine inhibitrice des cystéine protéases) (Comas *et al.*, 2004); Fmr1 ("*fragile X*

mental retardation") (Banerjee *et al.*, 2010); Tequila (neurotrypsine), et Debra qui est un médiateur de la dégradation protéique *via* le lysosome (Kottler *et al.*, 2011).

L'activation de la transcription ainsi que le contrôle subcellulaire de la traduction et celui de la stabilité des protéines induisent des modifications structurelles de neurones qui permettent la stabilisation des traces mnésiques.

C. LE SOMMEIL

1. Introduction générale

Le sommeil est conservé à travers toutes les espèces animales étudiées jusqu'ici (Cirelli & Tononi, 2008), et est nécessaire pour maintenir la fonction et les performances cognitive (Killgore, 2010). Le sommeil doit donc avoir au moins un rôle fondamental, une fonction conservée qui est nécessaire, et/ou dont les avantages l'emportent sur ses conséquences néfastes (période où l'animal est plus sensible aux prédateurs). Actuellement, il n'existe pas de consensus sur ce que cette fonction pourrait être.

Pendant le sommeil, la taille et le nombre de synapses diminuent (Bushey *et al.*, 2011). Il se produit aussi une augmentation pendant l'éveil de l'expression des protéines impliquées dans la potentialisation à long-terme et une augmentation pendant le sommeil de molécules impliquées dans la dépotentialisation (Cirelli *et al.*, 2004; Cirelli *et al.*, 2005b; Mackiewicz *et al.*, 2007), comme la calcineurine. Le processus de dépotentialisation exercerait un effet bénéfique pour la fonction neuronale en permettant une économie d'énergie et d'espace. Il permettrait ainsi de conserver et de renforcer les traces importantes issues de l'activité d'éveil.

Dans le sens large, le sommeil est défini comme une période d'inactivité. Cette période est associée à diverses caractéristiques qui sont communes aux drosophiles et aux mammifères (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). L'utilisation d'organismes « simples » comme le poisson zèbre, le nématode et la drosophile a été d'une grande aide pour caractériser les mécanismes du sommeil (Cirelli & Tononi, 2008; Crocker & Sehgal, 2010; Harbison *et al.*, 2009; Zimmerman *et al.*, 2008). L'ensemble de ces travaux suggèrent que les voies biochimiques impliquées dans le contrôle du sommeil sont les mêmes chez ces organismes que chez les mammifères (Shaw & Franken, 2003) (pour revue (Cirelli, 2003; Ho & Sehgal, 2005)).

Chez l'homme, le sommeil lent ("slow wave sleep" SWS ou NREM-sleep) comporte quatre stades qui se succèdent (pour revue (Diekelmann & Born, 2010)), toujours dans le

même ordre, lors de cycles de 70 minutes environ (Figure 14). C'est d'abord le sommeil léger (stade 1 et 2) : le cerveau génère alors des ondes lentes (5 à 7 hertz puis 12 à 16 hertz). Ensuite, la fréquence des ondes lentes diminue (1 à 3 hertz) alors que leur amplitude et leur abondance augmentent: c'est le sommeil profond (stade 3 et 4). Les cycles de sommeil lent sont entrecoupés par un sommeil avec des mouvements rapides des yeux ("rapid eye movement" REM-sleep). Ce dernier est appelé « sommeil paradoxal » car il est caractérisé par une activité cérébrale intense, comparable à celle de l'éveil, et par l'absence de tonus musculaire. Une nuit comprend quatre ou cinq phases de sommeil paradoxal ; mises bout à bout, elles représentent une durée de 1 heure à 1 heure 30 minutes, soit environ 15 % à 20 % de la durée totale du sommeil. Chez la plupart des mammifères, le sommeil s'organise ainsi, en cycles de quelques dizaines de minutes, avec la même alternance de sommeil lent et de sommeil paradoxal.

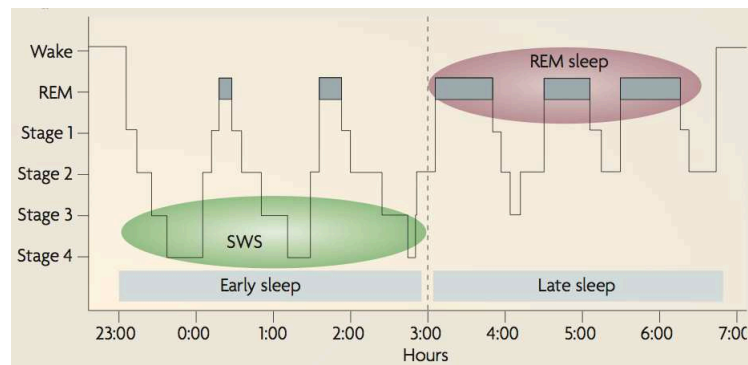


Figure 14 : Schéma des phases de sommeil chez l'Homme.

Le sommeil se caractérise par des alternances entre des phases de sommeil lent et de sommeil paradoxal. La 1ère partie du sommeil est caractérisée par la prédominance du sommeil lent alors que le sommeil paradoxal domine la fin de nuit. (Diekelmann & Born, 2010)

2. Le sommeil chez la drosophile

Chez la drosophile, les études du sommeil reposent principalement sur la technologie de laser qui a été à l'origine conçue pour étudier le comportement circadien (Figure 15). Les périodes de sommeil et d'éveil sont ainsi définies en fonction des mesures de l'activité locomotrice.

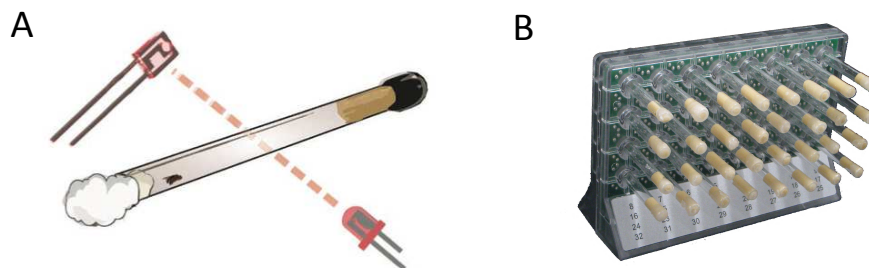


Figure 15 : Schéma du système trikinetics

(A) Une seule drosophile est introduite dans un tube en verre qui contient de la nourriture d'un côté et du coton de l'autre. Un laser infra-rouge (trait rouge en pointillé) passe au milieu du tube. Chaque fois que la drosophile passe devant le laser, le récepteur enregistre son passage et transmet l'information à un ordinateur. (B) Photographie d'un moniteur trikinetics. 32 drosophiles peuvent être enregistrées dans chaque moniteur.

Chez la drosophile, le sommeil est défini comme une période d'immobilité ≥ 5 min qui est caractérisée par:

- une augmentation du seuil d'excitabilité, caractéristique essentielle permettant de distinguer le sommeil du repos (Bushey *et al.*, 2007; Bushey *et al.*, 2009; Cirelli *et al.*, 2005a).

- un rebond de sommeil à la suite d'une privation de sommeil, ce qui correspond à une réponse homéostatique (Hendricks *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2000). De plus, une privation de sommeil prolongée (environ 60 h) provoque la mort (Shaw & Franken, 2003; Shaw *et al.*, 2002).

- une corrélation entre l'état de sommeil et la réduction de l'activité cérébrale (mesure électrophysiologiques par "local field potential") (Nitz *et al.*, 2002; van Swinderen *et al.*, 2004).

- une modification de l'expression des gènes (Cirelli *et al.*, 2005b; Zimmerman *et al.*, 2006). Ainsi, l'éveil est associé à la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress, facteurs de transcription, réponse immunitaire, transmission glutamatergique. Ceux associés

au sommeil sont impliqués dans le métabolisme des lipides, le recyclage de la membrane, et le développement du système nerveux.

- des périodes de sommeil qui surviennent principalement la nuit et qui sont entraînées par le rythme circadien (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Néanmoins les drosophiles dorment aussi le jour (425 min à 18°C soit 41 % du sommeil sur une journée), mais ce sommeil est plus fragmenté.

- des périodes de sommeil qui sont plus abondantes chez des drosophiles jeunes que chez des drosophiles âgées (Koh *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2000).

- enfin, les hypnotiques et certains stimulants (par exemple, la caféine et la modafinil) affectent le sommeil (Shaw *et al.*, 2000).

Le sommeil des drosophiles et des mammifères partage donc les mêmes caractéristiques principales.

L'analyse de la qualité du sommeil se fait principalement sur la durée des épisodes de sommeil et sur le nombre de ces épisodes (Borbely, 1982). Il faut noter que le sommeil peut être très variable d'un individu à l'autre car c'est un comportement complexe qui dépend de facteurs génétiques et environnementaux. Le contrôle du fond génétique et l'analyse de nombreux individus permet néanmoins d'étudier l'effet d'une mutation par rapport à une souche de référence « sauvage ».

3. Les coprs pédonculés: centre de contrôle du sommeil

Chez la drosophile, les techniques de cribles génétiques classiques ont permis d'identifier de nombreux composants moléculaires. Les gènes isolés à partir des cribles génétiques comprennent ceux codant: Shaker (canal potassique voltage-dépendant), plusieurs neurotransmetteurs (dopamine, octopamine et sérotonine), des molécules qui font partie de la voie de l'AMPc, des stéroïdes, des protéines de choc thermique ou chaperons, des protéines impliquées dans le rythme circadien, des protéines impliquées dans le transport des ARNm (Fmr1) et des protéines qui jouent un rôle dans la structure de la chromatine.

Des recherches antérieures avaient révélé que nombre de ces gènes étaient également importants pour l'apprentissage et/ou la mémoire (donc la plasticité synaptique). Il a été démontré que l'expression de la plupart de ces gènes est fortement enrichie au niveau des CPs, centre de la mémoire olfactive. D'autres études sont venues confirmer cette corrélation

positive entre la plasticité synaptique et le besoin de sommeil. En effet, l'exposition à un environnement enrichie qui va accroître la force synaptique dans plusieurs circuits neuronaux provoque une augmentation de la quantité de sommeil (Bushey *et al.*, 2011; Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006).

Un criblage anatomique à l'aide de la protéine Shi^{TS} a permis d'identifier les structures du cerveau qui régulent le sommeil. Cette étude a confirmé le rôle des CPs dans ce processus car c'est le blocage de cette structure qui produit la plus grande réduction du temps de sommeil (Pitman *et al.*, 2006). Comme il a été démontré que la durée du sommeil est inversement proportionnelle à l'activité de la PKA (Hendricks *et al.*, 2001), Joiner *et al.* ont exprimé une isoforme constitutivement active de la PKA dans différents sous-types de neurones et ont ainsi confirmé l'importance des CPs (Joiner *et al.*, 2006). Récemment, d'autres neurones (« ExFl2 ») jouant un rôle dans le sommeil ont été identifiés par l'équipe de Paul Shaw (Donlea *et al.*, 2011). Il s'agit de neurones qui projettent au niveau du corps en éventail. L'activation de ces neurones provoque l'endormissement de la drosophile.

4. Les différents mécanismes impliqués dans le sommeil et la mémoire

Différents composants ont été indépendamment impliqués dans le contrôle du sommeil et la formation de la mémoire :

i) Le produit du **gène *fmr1*** est enrichi dans les CPs au niveau des épines dendritiques (Feng 1997) (Schenck *et al.*, 2002). L'une des caractéristiques de sa perte de fonction correspond à un défaut de suppression des synapses immatures (Comery *et al.*, 1997; Hinton *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 2002; Restivo *et al.*, 2005). A l'inverse, la surexpression de FMR1 chez la drosophile provoque un "sous développement" dendritique et axonal, ainsi que la perte de la différenciation synaptique (Pan & Broadie, 2007; Pan *et al.*, 2004). De plus, il a été constaté que le temps de sommeil augmente lorsque la fonction de FMR1 est perdue, et diminue lorsque FMR1 est surexprimé dans les CPs de drosophiles adultes (Bushey *et al.*, 2009). Cette protéine est aussi impliquée dans la formation de la MCT et de la MLT chez la drosophile (paradigme du comportement de cour) (Banerjee *et al.*, 2010).

ii) L'**octopamine** et la **dopamine** sont des signaux d'éveil. Leur rôle dans l'apprentissage et leurs effets sur les CPs par l'activation de la voie PKA a été particulièrement bien caractérisé. Ainsi, ces neurotransmetteurs sont nécessaires pour l'apprentissage appétitif

et aversif, respectivement (Schwaerzel *et al.*, 2003), et la PKA pourrait interagir avec Shaker et Quiver afin de moduler l'excitabilité au niveau des CPs et donc l'éveil (Yao & Wu, 2001).

iii) **La sérotonine** régule le sommeil chez la drosophile *via* le récepteur d5-HT1A au niveau des CPs. L'augmentation du taux de sérotonine de façon génétique ou pharmacologique augmente le taux de sommeil chez les drosophiles sauvages (Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2005). Pour ce qui est des effets sur la mémoire, il a été démontré que la régulation de la sérotonine est critique pour la formation de la mémoire de lieu (Sitaraman *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que l'augmentation ou la diminution du taux de sérotonine améliore ou réduit respectivement la MRA (Lee *et al.*, 2011). La libération endogène de sérotonine viendrait des neurones DPM qui projettent sur les lobes α/β (Lee *et al.*, 2011).

iiii) **L'hormone ecdysone** coordonne le développement post-embryonnaire et est nécessaire pour le remodelage neuronal (Hewes, 2008). L'administration d'ecdysone chez des drosophiles adultes augmente le temps de sommeil de manière dose-dépendante, alors que le blocage de la synthèse d'ecdysone ou celui du récepteur de l'ecdysone (EcR), réduit le temps de sommeil (Ishimoto & Kitamoto, 2010). Pour ce qui est des effets sur la mémoire, l'ajout d'ecdysone lors d'un conditionnement (paradigme de comportement de cour) améliore la MLT, alors que l'ajout ecdysone pendant la consolidation altère la mémoire (Ishimoto *et al.*, 2009). De plus, un conditionnement espacé et une privation de sommeil aboutissent tous deux à une augmentation du taux d'ecdysone. Enfin, le traitement par l'ecdysone augmente l'activité de CREB (Ishimoto & Kitamoto, 2010). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le système ecdysone peut représenter un mécanisme systémique capable non seulement de contrôler la plasticité du cerveau en réponse à la stimulation de l'environnement, en particulier dans les CPs, mais aussi d'affecter directement le sommeil.

Enfin, il a été montré que la quantité de sommeil est augmentée chez des drosophiles qui ont été conditionnées avec un protocole de comportement de cour qui génère de la MLT (Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006). Par la suite, la même équipe a démontré que l'induction du sommeil (grâce aux neurones « ExFl2 ») après un protocole qui génère de la MCT provoque la formation de MLT (Donlea *et al.*, 2011). La régulation du sommeil est donc importante pour la consolidation de la MLT.

Les CPs sont étroitement impliqués dans la réorganisation spatiale et temporelle des traces mnésiques, comme indiqué par les résultats d'imagerie calcique (Berry *et al.*, 2008). Le

fait que ces traces mnésiques peuvent persister pendant une période de 24 h suggère que le sommeil peut avoir un rôle fonctionnel, peut-être de favoriser la réorganisation des souvenirs à travers différents circuits du cerveau, semblable à la réactivation et la redistribution des mémoires dépendantes de l'hippocampe vers les régions néocorticales qui pourraient se produire pendant le sommeil lent, au moins chez les mammifères (Diekelmann & Born, 2010; Rattenborg *et al.*, 2011). Malheureusement, l'imagerie calcique est invasive et peu propice à l'analyse de la physiologie des états comportementaux. Ainsi, on ignore si le sommeil est important pour l'apparition et/ou le transfert de ces traces mnésiques.

5. Effet de la réduction du sommeil sur l'apprentissage et la mémoire

a) Chez les mammifères

Les études chez la souris ont montré qu'une privation de sommeil juste après l'apprentissage (paradigme de conditionnement de peur) perturbe la formation de la mémoire spatiale (Smith & Rose, 1996; Smith & Rose, 1997), empêche la formation de la mémoire de reconnaissance des nouveaux objets (Palchykova *et al.*, 2006b) et des "contextual fear" (où l'animal apprend à associer un environnement à l'US) mais pas des "cued fear" (où l'animal apprend à associer un *stimulus*, comme un son, à l'US) (Graves *et al.*, 2003; Vecsey *et al.*, 2009). Des études complémentaires avec le "Morris water maze" ont permis de montrer que la privation de sommeil affecte de manière différente les différentes mémoires. Ainsi, les mémoires dépendantes de l'hippocampe sont sensibles à une privation de sommeil alors que les mémoires indépendantes de l'hippocampe sont plus résistantes aux privations de sommeil (Guan *et al.*, 2004; McDermott *et al.*, 2003; Ruskin *et al.*, 2004).

Il est connu que la formation de la mémoire au niveau de l'hippocampe nécessite une plasticité synaptique dépendante de l'activité de la PKA (pour review: (Nguyen & Woo, 2003)). Or, il a été démontré qu'une courte privation de sommeil perturbe le fonctionnement de l'hippocampe en réduisant la quantité d'AMPC *via* l'activation de phosphodiésterases (Vecsey *et al.*, 2009). La privation de sommeil pourrait donc perturber la consolidation en modifiant l'activité de la voie AMPc/PKA. Cette modification pourrait expliquer pourquoi les mémoires indépendantes de l'hippocampe sont plus résistantes aux privations de sommeil.

Des études réalisées en appliquant des privations de sommeil avant le conditionnement chez l'Homme ont permis de montrer que l'encodage des mémoires temporelles (Harrison &

Horne, 2000; Yoo *et al.*, 2007), verbale (Drummond & Brown, 2001; Drummond *et al.*, 2000) et émotionnelle (pour revue (Walker & Stickgold, 2006)) est moins bonne lorsque les individus sont en dette de sommeil.

Il est possible chez l'Homme de réaliser des privations de sommeil sélectives. De telles études ont mis en évidence l'importance du SWS pour les mémoires déclaratives et du REM pour la mémoire procédurale (Plihal & Born, 1999). Cependant, les privations spécifiques des différentes étapes du sommeil sont difficiles à interpréter car le réveil est lui-même source de stress ce qui peut influencer la consolidation de la mémoire.

b) Chez la drosophile

L'étude de mutants a permis de confirmer le lien entre sommeil et mémoire. Ainsi, les drosophiles mutantes qui présentent un temps de sommeil réduit présentent aussi des défauts de MCT (paradigme de conditionnement de lieu « heat box conditioning ») (Bushey *et al.*, 2007). Par la suite, plusieurs études ont utilisé la privation de sommeil pour analyser le rôle du sommeil dans la consolidation ou bien l'effet de manque de sommeil sur l'apprentissage. Il a ainsi été démontré qu'une privation de 6 à 12 h de sommeil entraîne des défauts d'apprentissage (paradigme aversif de suppression phototaxique) ce qui montre une homologie importante entre les drosophiles et les mammifères (Seugnet *et al.*, 2008). Il a aussi été démontré qu'une privation de 24 h est délétère pour la MCT olfactive aversive (Li *et al.*, 2009b). Cependant, une période de repos de 4 h après la privation est suffisante pour que les drosophiles récupèrent des capacités cognitives normales. De plus, le blocage de la transmission synaptique des CPs ou la réduction de la quantité d'AMPC dans les CPs pendant la privation de sommeil permet de sauver le défaut de MCT (Li *et al.*, 2009b).

Pour les privations de sommeil pendant la période de consolidation, il a été démontré qu'une privation de 24 h entre le conditionnement et le test à un effet délétère sur la MLT (Li *et al.*, 2009b). Des privations plus courtes ont aussi été réalisées, et une perte de 4 h de sommeil après le conditionnement (entre 0 et 8 h) produit un effet délétère sur la MLT (paradigme de comportement de cour, test à 48 h) (Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006).

Aucune étude du lien entre le sommeil et la MRA n'a été réalisée à ce jour chez la drosophile.

D. LE ROLE DU RYTHME CIRCADIEN SUR LA MEMOIRE

Il est intéressant de noter ici que la modulation circadienne de la mémoire en fonction du temps de la journée a été observée chez une grande variété d'espèces d'invertébrés et de vertébrés (pour revue (Gerstner *et al.*, 2009)). Ces effets circadiens sur la mémoire (formation et consolidation) chez différents organismes modèles couvrent les différentes catégories chronobiologiques de rythmes d'activité, soit diurne, nocturne ou crépusculaire. Les oscillateurs circadiens peuvent ainsi largement moduler les processus cognitifs de manière spécifique. Ces effets peuvent être robustes, même après des privations de sommeil ou en cas de fatigue (Monk & Folkard, 1978; Wright, 2006). Il a ainsi été démontré une modulation circadienne de la MLT par la mélatonine chez le poisson zèbre diurne, *Danio rerio* (Rawashdeh *et al.*, 2007). Des modulations du rythme circadien de la mémoire chez l'aplysie (meilleur apprentissage le jour que la nuit) (Fernandez *et al.*, 2003). Chez les souris, les performances d'apprentissage et de mémorisation peuvent fluctuer en fonction de l'heure de la journée (Chaudhury & Colwell, 2002; Mistlberger *et al.*, 1996; Valentinuzzi *et al.*, 2000). Enfin, chez la drosophile, la MCT olfactive est modulée par l'horloge circadienne endogène (Lyons & Roman, 2009). Ainsi, l'apprentissage est plus performant lorsque le conditionnement a lieu en début de nuit. Cependant, ce phénomène est très faible car il est nécessaire de se placer dans des conditions limitantes pour l'observer (1 pulse de choc de 90 V et 10 sec CS+).

MATERIELS & METHODES

1. Stock de drosophiles

La souche sauvage de référence est *Canton-Special* (CS), toutes les lignées utilisées sont élevées dans des étuves à 18 ou 25°C (et 60% d'humidité) avec un cycle jour/nuit 12h /12h. La lumière s'allume à 08 h 00, zeitgeber time 0 (ZT0). Le milieu de culture est composé d'agar, de levure, de maïs et d'un fongicide. Une cinquantaine de drosophiles adultes âgées de 3-5 jours sont placées dans des bouteilles de 5 cm de diamètre (175ml) contenant du milieu. Tous les 3-4 jours, ces adultes sont « repiqués » dans une bouteille neuve. Ces adultes sont changés toutes les 2 semaines.. Les drosophiles utilisées pour les expériences sont des mouches CS âgées de moins de 2 jours et dont le développement s'est effectué à 18°C (ce qui nécessite approximativement 3 semaines).

La souche *white*¹¹⁸ de génotype *w-/w-* (notée white par la suite), a les yeux blancs et possède le même fond génétique que la souche CS. La souche MB-Switch est homozygote pour le pilote d'expression et possède le même fond génétique que la souche CS.

Les lignées ARNi proviennent du « Vienna Drosophila RNAi Center » (VDRC ; <http://www.vdrc.at/>) et sont *w-/w-*. La séquence du ARNi est située en aval de séquences UAS^{GAL4} et l'ensemble est contenu dans un élément-P modifié qui exprime constitutivement une copie tronquée du gène *white+*(noté p(w+)).

a) Outcross

Afin d'homogénéiser le fond génétique des souches analysées, les lignées ARNi ont été outcrossées (trois croisements successifs) avec la souche white. Comme les mâles ne recombinent pas, ce sont les femelles vierges qui sont utilisées pour homogénéiser le fond génétique du chromosome porteur de l'élément-P (qui contient le ARNi). Les femelles vierges homozygotes pour le ARNi [œil rouge] sont d'abord croisées avec des mâles white

(w-/w-) [œil blanc]. Quinze femelles vierges hétérozygotes (de la génération F1) qui ont le phénotype [œil orange] (car elles ne possèdent qu'une copie de l'élément-P) sont utilisées pour être croisées avec cinq mâles white (w-/w-). Cette dernière étape est répétée une seconde fois. Les hétérozygotes (mâles et femelles vierges) obtenus à ce dernier croisement sont croisés entre eux, et seuls les descendants aux yeux rouges (homozygotes pour l'élément-P) sont gardés pour générer la lignée ARNi.

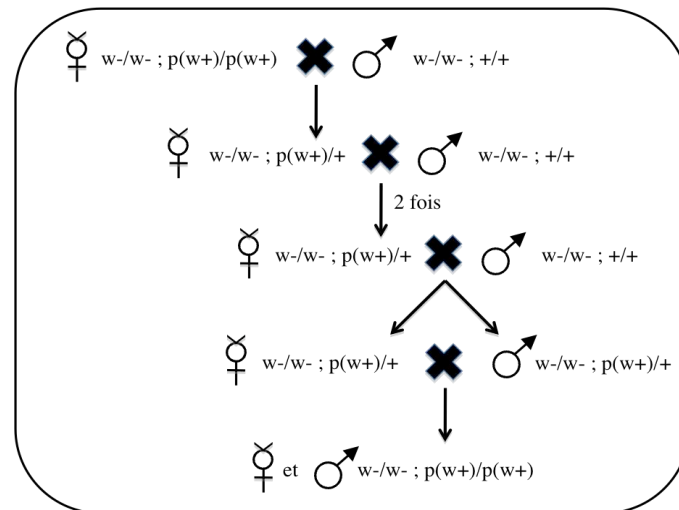


Figure 16 : Schéma des croisements pour "outcrosser" l'élément-P.

P(w+) : élément-P inséré dans un chromosome, seul les descendants utilisés sont représentés.

Pour les souches *per⁰* et *per^S* (mutant EMS), l'outcross est réalisé en aveugle. Comme le gène *period* est situé à environ 100 kb du gène *white*, la probabilité pour qu'un événement de recombinaison se produise entre ces deux gènes est très faible. J'ai donc utilisé le gène *white⁺* comme marqueur phénotypique pour "suivre" l'allèle mutant de *period* en récupérant les drosophiles aux yeux rouges. Pour rendre les souches homozygotes, la souche contenant le chromosome balancier FM7c a été utilisée. La présence de l'allèle mutant dans la nouvelle souche a ensuite été vérifiée par PCR et par l'étude du rythme de ces lignées.

2. Expression de l'ARNi (système UAS^{GAL4} - Gene-Switch)

L'expression du ARNi est induite en plaçant les drosophiles sur un milieu contenant du RU486 (mifépristone) [Sigma] à une concentration finale de 80 µg.ml⁻¹ (Mao *et al.*, 2004). La solution mère est préparée en diluant 1g de RU486 dans 250 ml d'EtOH à 80%. Le milieu contenant le RU est préparé le jour même de la mise en bouteille. L'induction est démarrée 48h avant le conditionnement et se poursuit jusqu'au test. Le pilote d'expression *MB-Switch* (spécifique des CPs) (Mao *et al.*, 2004) a été utilisé pour l'expression des ARNi.

Croisements pour l'étude par ARNi

Quatre croisements ont été réalisés (3 contrôles positifs et l'ARNi) :

Contrôle n°1 (+/+); Contrôle n°2 (*MB-Switch*/+); Contrôle n°3 (+/*p(w+)*); le croisement d'intérêt (*MB-Switch/p(w+)*).

Chaque croisement est réalisé avec 60 femelles vierges et 30 mâles. Ces croisements sont repiqués 3 fois par semaine pendant 3 semaines à 18°C et 60% d'humidité.

3. Conditionnement aversif olfactif

Les mouches ont été entraînées et testées en utilisant un conditionnement de type Pavlovien. Ce protocole a été mis au point par S. Benzer en 1974 (Quinn *et al.*, 1974), puis amélioré par T. Tully et W. Quinn en 1985 (Tully & Quinn, 1985) et enfin par A. Pascual et T. Prémat (Pascual *et al.*, 2004). Les drosophiles sont exposées successivement à deux odeurs répulsives dont l'une est associée à une série de chocs électriques. On peut ensuite déterminer dans quelle mesure elles ont retenu cette information à l'aide d'un test pendant lequel les drosophiles peuvent choisir d'aller dans un tube contenant l'odeur 1 ou bien un tube contenant l'odeur 2.

a) Préparation au conditionnement

Pour les expériences avec induction de l'ARNi: La veille du conditionnement, entre 60 et 80 drosophiles, âgées de 0 à 2 jours et issues d'une bouteille d'élevage sont placées dans des nouvelles bouteilles (bouteille de conditionnement) et conservées dans une étuve à 25°C.

Pour les expériences sur le sommeil: Entre 60 et 80 drosophiles, âgées de 0 à 2 jours et issues d'une bouteille d'élevage sont placées dans une nouvelle bouteille (cela constitue $n = 1$). Ces bouteilles sont placées dans une nouvelle étuve à 18°C qui ne contient pas de bouteilles d'élevages pour éviter les problèmes d'odeur et pour que ces drosophiles soient le plus possible au calme. 3 à 4 jours après, ces drosophiles sont prêtes à être utilisées pour le conditionnement.

Les mouches sont placées dans la pièce de comportement au moins 30 minutes avant le début de l'expérience. Les pièces de comportement sont réglées à 25°C et 80% d'humidité.

Les substances odorantes utilisées sont deux alcools naturellement répulsifs pour la drosophile : le 4-méthyl cyclohexanol (MCH) [Fluka] et le 3-octanol (OCT) [Fluka]. Leur préparation se fait par dilution de 58 μ l de MCH ou de 52 μ l d'OCT dans 175 ml d'huile de vaseline [VWR] (à une concentration de 0.360mM et 0.325mM respectivement). Comme pour les mouches, les bouteilles d'odeur sont placées dans la pièce de comportement au moins 30 minutes avant le début de l'expérience.

b) Conditionnement

Le conditionnement est réalisé dans des pièces en surpressions où l'air est purifié par du charbon actif. La température est à 25°C avec une humidité de 80%. Ces conditions permettent à la fois une meilleure évaporation des odeurs et une meilleure conductivité électrique. Le dispositif utilisé est composé de 6 barillets. Chaque barillet contient 6 compartiments dont les parois sont recouvertes d'une grille électrifiable en cuivre. Chaque barillet est équipé de valves permettant la circulation de l'air et des odeurs.

Une quarantaine de mouches de même génotype sont enfermées dans chaque compartiment du barillet après s'être assuré que le courant électrique circule bien le long des grilles et que l'air passe correctement. Les barillets sont alors branchés à un système d'électrovannes assurant les débits d'air provenant des bouteilles d'odeur et à un générateur pour les chocs électriques. L'ensemble est contrôlé par un système informatique.

Les mouches reçoivent 12 chocs électriques de 1 sec 25 et 60 mV pendant 1 min en présence de la première odeur, c'est le stimulus conditionné (CS+). Après une période de repos de 45 sec avec un courant d'air sans odeur, les mouches sont exposées à la deuxième odeur seule pendant une minute (CS-). Dans le cas d'un protocole massé, 5 cycles de conditionnement sont répétés sans intervalle de repos. Ce conditionnement dure environ 25 min. Alors que dans le cas d'un conditionnement espacé, les 5 cycles sont séparés par un interval de repos de 15 min. Ce conditionnement dure environ 1 h 30. Pour le cas des expérimentations sur le sommeil avec un conditionnement espacé, les drosophiles choquées sur l'odeur B sont traitées en parallèle de celles qui sont choquées sur l'odeur A pour assurer un conditionnement au même temps circadien.

Pour éviter un biais dû aux natures des deux odeurs, à leur concentration, à leur reconnaissance par les différentes lignées ou à des différences de débits d'air, chaque lignée est conditionnée deux fois (avec deux groupes de mouches) en inversant l'odeur qui sera associée aux chocs électriques. Dans le premier conditionnement, on associe l'odeur OCT

avec le choc électrique. Ensuite, les drosophiles sœurs (issues de la même bouteille de conditionnement) sont choquées avec l'association de l'odeur MCH lors du deuxième conditionnement.

À la fin du conditionnement, les mouches sont placées dans des tubes contenant du milieu de culture. Ces tubes sont placés dans une étuve à 18 ou 25°C suivant l'expérience.

c) Test

Les mouches sont placées dans la pièce de comportement au moins 30 min avant le début du test. Les tests ont lieu 24 heures (\pm 3h) après le conditionnement.

Comme pour le conditionnement, le test s'effectue dans l'obscurité afin que les mouches ne soient pas perturbées par l'environnement. Le système est composé d'un ascenseur relié à une pompe à air et aux deux bouteilles d'odeur. L'air est aspiré au niveau de la partie centrale avec un débit de 800 ml/min soit 400 ml/min par compartiments. Après s'être assuré que les débits d'air provenant des deux bouteilles sont similaires, les mouches sont bloquées dans la machine à test. Grâce à un système coulissant, les mouches sont alors descendues dans une chambre où convergent les deux odeurs. Elles ont alors 1 minute pour choisir l'une des deux odeurs avant de faire remonter la partie coulissante, empêchant dès lors tout passage d'un compartiment à l'autre. Les mouches sont alors placées dans des tubes avant d'être comptées.

d) Calcul des Indices de Performances (IP ou score)

Pour calculer les indices de performance (IP), on détermine tout d'abord un $\frac{1}{2}$ indice de performance (aussi appelé $\frac{1}{2}\lambda$) qui rend compte de la part de la population de drosophiles qui s'est souvenue qu'une odeur était associée à un choc électrique. Ce $\frac{1}{2}\lambda$ est calculé de la manière suivante :

$$\frac{1}{2}\lambda_A = \frac{(CS-)-(CS+)}{(CS-)+(CS+)} \quad IP = \frac{\frac{1}{2}\lambda_A + \frac{1}{2}\lambda_B}{2}$$

CS+ : nombre de drosophiles qui ont choisi le mauvais côté, précédemment associé aux chocs électriques.

CS- : nombre de drosophiles qui ont choisi le bon côté.

$\frac{1}{2}\lambda_A$: demi-score de performance pour les drosophiles conditionnées avec octanol comme CS+.

$_{1/2}\lambda_B$: demi-score de performance pour les drosophiles conditionnées avec methylcyclohexanol comme CS+.

Ainsi, une distribution de 50/50 (pas de mémoire) donne un IP = 0.

e) Analyses statistiques

Toutes les expériences sont réalisées sur des populations de mouches, ce qui permet de faire des validations statistiques. Pour cela, un test de Student est réalisé à partir d'Excel ou Prism. Une différence est jugée significative si la valeur de P est inférieure à 0,05. Lorsqu'il y a plus d'un génotype contrôle, on réalise un ANOVA à l'aide du logiciel Prism.

f) Test de l'olfaction

Afin de vérifier les capacités olfactives des différentes lignées, un test d'olfaction après choc électrique est réalisé. En effet, il a été démontré que la sensibilité olfactive des mutants était plus faible après avoir reçu des chocs électriques) (Preat, 1998).

Les mouches sont introduites dans le barillet dans lequel elles vont recevoir des chocs électriques en présence de l'odeur 1 pendant une minute. Immédiatement, les mouches sont récupérées et placées dans la machine à test, où elles doivent choisir entre un compartiment avec de l'air et un autre avec l'odeur 2. Les odeurs utilisées étant aversives, les mouches ayant une olfaction normale vont majoritairement choisir le compartiment avec l'air. Après une minute de test, les mouches de chaque compartiment sont collectées séparément et comptées. Les scores obtenus ne prennent en compte qu'un demi-score de performance. Ce protocole permet également de vérifier que l'activité locomotrice des mouches est normale.

g) Evitement aux chocs électriques

Ce protocole permet de vérifier que la sensibilité aux chocs électriques et que la locomotion sont intacts dans les différentes lignées utilisées. Deux barillets recouverts de grilles électrifiables sont placés face à face en position horizontale et reliés par une pièce en plastique. Un seul des deux barillets est électrifié et les mouches doivent choisir entre les deux compartiments pendant une minute. Les mouches sont récupérées séparément, comptées et un indice de performance est calculé.

4. Analyse du sommeil

L'analyse est réalisée grâce au système trikinetics. A l'aide d'un pneumocapteur (sans CO₂), les drosophiles femelles sont introduites une par une dans un tube de 65 mm de longueur et 5 mm de diamètre qui contient de la nourriture (identique à celle des bouteilles d'élevage). Chaque tube contient donc une seule drosophile. Les tubes sont ensuite placés dans un moniteur qui mesure l'activité des drosophiles grâce à un laser. A partir de ces données, une macro excel (laboratoire de Paul Shaw) permet de quantifier le sommeil des drosophiles. Le sommeil correspond à 5 min d'inactivité.

Afin de réaliser la privation de sommeil, ces moniteurs sont placés sur un plateau dont l'inclinaison varie entre +60° et -60°. Pour le protocole de privation, le basculement est activé pendant 30 sec toutes les 5 min durant 4h ce qui empêche les drosophiles de dormir. Le plateau bascule ainsi 3 fois toutes les 5 min.

Pour le protocole de contrôle mécanique le basculement est activé pendant 30 sec toutes les minutes durant 12 min. Et cela répété toutes les heures pendant 4 h. Les drosophiles reçoivent ainsi exactement le même nombre de stimulations mécaniques mais sur une période plus courte ce qui leur permet de dormir pendant 48 min.

5. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

Les extractions sont réalisées uniquement sur les têtes. Les drosophiles (une 50^{aine}) sont contenues dans un eppendorf de 1,5ml qui est placé dans de l'azote liquide. Un vortex permet de séparer les têtes des thorax. Les têtes sont ensuite récoltées grâce à des tamis en inox puis elles sont broyées dans un tube placé dans de la carboglace. Les ARN totaux sont extraits du broyat en utilisant le kit Qiagen RNeasy Plant. La mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm au spectrophotomètre permet d'établir la concentration des ARN extraits et d'évaluer leur propreté. Pour préparer les ADNc, 1,5µg d'ARN totaux sont copiés par la reverse transcriptase avec le kit Invitrogen Superscript III selon les conditions du fournisseur. Des hexamères aléatoires et des oligodT servent d'amorces.

6. PCR Quantitative (PCR-Q) en temps réel

Nous avons comparé le niveau d'expression d'un ARNm donné (ici DSCAM) par rapport à celui issu d'un gène de référence qui est l'*alpha tubuline* (CG1913). Les amorces

spécifiques de chaque gène ont été établies par le site roche (www.roche-applied-science.com).

L'amplification a été réalisée en utilisant des plaques de 96 puits avec un volume final de réaction de 10µl (concentration des amorces à 0,5µM). Le mix utilisé est SYBR GreenI Master de chez Roche. La machine utilisée est un Light Cyclers 480.

Le programme se déroule en plusieurs étapes :

- 1/ Une étape de dénaturation préliminaire à 95°C pendant 5 minutes
- 2/ 40 cycles comportant une étape d'hybridation-amplification à 60°C de 30 secondes et une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes
- 3/ Une étape finale permet de déterminer la courbe de fusion des amplicons afin d'estimer leur taille et leur spécificité.

Chaque réaction est réalisée en triplicat et deux dilutions différentes sont réalisées pour chaque ADNc (1/100^{ème} et 1/200^{ème}).

Le logiciel du Light Cyclers calcule les « crossing point » (Cp, cycle à partir duquel la machine commence à détecter la fluorescence) de chaque réaction, puis la médiane de chaque triplicat. Pour chaque ADNc, on obtient un ΔCp (ΔCp = Cp gène cible - Cp gène référence). Le ratio d'expression du gène cible est ensuite déterminé par la formule $2^{-(\Delta Cp_{OCT} - \Delta Cp_{UN})}$. Ainsi un ratio de 1 permet de conclure qu'il n'y a le même rapport entre gène cible et gène référence chez les mouches UN et les mouches OCT (donc pas de modification d'expression du gène).

Transcrit amplifié	Amorce	Séquence de 5' → 3'	Exon hybridé	TM
Tous	sens	GACGCAATCCCAACCTGTA	19	59
	anti-sens	GCATAGGGGCAGATTTTCATC	20	59
17.1	sens	TGCCACCTTAACCGTTACC	16	58
	anti-sens	TGATTATGACGAGCAGAGCC	17.1	60
17.2	sens	TGCCACCTTAACCGTTACC	16	58
	anti-sens	CATGAAGTTGAGATCGAGCC	17.2	60

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour *dscam*.

Liste des couples d'oligonucléotides utilisés pour amplifier les différents transcrits du gène *dscam*. La température d'hybridation (TM) est indiquée en degré celsius.

7. PCR (« polymerase chain reaction »)

Afin de vérifier les souches $per^0_{(CS)}$ et $per^S_{(CS)}$ après "outcross", nous avons réalisé des PCRs. Les oligonucléotides ont été construits afin que le dernier nucléotide coté 3'OH de l'amorce anti-sens (R) ne s'hybride pas avec la séquence génomique mutée de per^0 ou per^S .

Nom de l'Oligo	Séquence de 5' → 3'	TM
per^0 -F	CCATACCGCTTCCTCATCC	59
per^0 -FM	CCATACCGCTTCCTCATCT	57
per^0 -R	GTCCGACGACAAATTCCAG	57
per^S -F	TCCGTCGGACACGGTCAAG	61
per^S -R	ATCTCGCCGAGCATCACGC	61
per^S -RM	ATCTCGCCGAGCATCACGT	59

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier les différents allèles de *period*. Amorces utilisées pour amplifier l'allèle per^+ en contrôle de per^0 : per^0 -F et per^0 -R. Amorces utilisées pour amplifier l'allèle: per^0 -FM et per^0 -R. Amorces utilisées pour amplifier l'allèle per^+ en contrôle de per^S : per^S -F et per^S -R. Amorces utilisées pour amplifier l'allèle *period*^S: per^S -F et per^S -R.

Afin de vérifier la souche $per^0_{(CS)}$ et $per^S_{(CS)}$, l'étape d'hybridation est réalisée à 60°C et 62°C respectivement.

8. Imagerie calcique *in-vivo* de la réponse aux odeurs

Nous avons utilisé la sonde GCaMP3.0 (Tian *et al.*, 2009) comme rapporteur calcique. La sonde est exprimée au niveau des neurones MB-V2 à l'aide du système UAS^{GAL4} et du pilote d'expression R71D08 (Séjourné *et al.*, 2011). La réponse calcique des MB-V2 est mesurée 24 h après le conditionnement. Les drosophiles femelles sont collées (sans anesthésie) avec de la glue et disséquées comme décrit pour l'imagerie *in-vivo* (Fiala & Spall, 2003). Afin de limiter les mouvements de la drosophile pendant l'acquisition, le proboscis est collé sur le thorax avec de la glue. La chambre d'enregistrement qui contient la drosophile est ensuite placée sous l'objectif 20x à immersion (NA = 1, Leica) d'un microscope confocal (TCS-SP5, Leica). Le cerveau de la drosophile est donc observé du dessus. Les expériences sont réalisées à 20°C et l'ouverture au niveau du cerveau de la drosophile est baignée et perfusée en continue par une solution Ringer pour drosophile (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2

mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 36 mM sucrose, 5 mM HEPES-NaOH; pH 7.3; 305 mOsm) qui est oxygénée par bullage.

Les odeurs sont diluées 250 fois dans 100ml d'huile paraffine dans une bouteille en verre. Les bouteilles contrôles "d'air" ne contiennent que 100ml l'huile. La sonde GCaMP3.0 est excitée par un laser argon (488nm). La fluorescence émise par la sonde est collectée par un photomultiplicateur aux longueurs d'ondes 505-555 nm. La lumière collectée est issue d'une section horizontale d'un hémisphère du cerveau.

Les odeurs (CS+ et CS-, l'ordre est déterminé de façon aléatoire) sont ensuite présentées aux drosophiles pendant 1 sec avec un interval de 3 min pendant lequel de l'air est diffusé. L'enregistrement est réalisé deux fois pour chaque odeur afin de s'assurer de la capacité des drosophiles à sentir l'odeur pendant l'expérience mais seul les premières présentations sont conservées pour l'analyse. L'enregistrement est réalisé au niveau du "*middle superiomedial protocerebrum*" (msnpr).

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide d'un programme Matlab écrit par Pierre-Yves Plaçais (Séjourné *et al.*, 2011). La region d'intérêt est défini manuellement au niveau des projections des MB-V2. La courbe en fonction du temps est ensuite normalisée en % de changement de la fluorescence $100(F-F_0)/F_0$. La valeur de base F_0 est déterminée par la moyenne sur 1 sec avant l'arrivé de l'odeur. Enfin, la réponse induite par l'odeur est calculée comme étant la moyenne du pic de réponse.

PARTIE I: Le rappel des memoires consolidees apres privation de sommeil est module par le rythme circadien

1. Introduction

Le but de notre étude est de mieux comprendre les interactions qui existent entre le sommeil et la mémoire. S'il est de plus en plus clair que le sommeil joue un rôle crucial dans la consolidation de la mémoire, nous ne connaissons toujours pas le rôle exact joué par le sommeil lors de ce processus. L'un des moyens d'étude couramment utilisés consiste à priver un organisme de sommeil, puis, d'étudier les conséquences de cette privation sur la mémorisation. Chez les mammifères, la privation de sommeil semble affecter principalement les mémoires dépendantes de l'hippocampe. La privation de sommeil pendant la période de consolidation perturbe la formation de la mémoire spatiale (paradigme de "contextual fear") mais pas "cued fear". Ainsi, le manque de sommeil n'affecterait pas de la même façon des formes distinctes de mémoire.

Nous avons choisi d'étudier chez la drosophile l'effet sur la mémoire de courtes privations de sommeil. En effet, cet organisme constitue un modèle bien établi pour l'analyse et de la mémoire, et du sommeil ; les mécanismes cellulaires de base qui sous-tendent ces processus étant conservés des invertébrés aux mammifères.

Nous avons analysé les deux types de mémoire consolidée qui ont été décrits chez la drosophile (Tully *et al.*, 1994). Un conditionnement associatif aversif répété permet de

générer de la MRA, une mémoire consolidée résistante à l'anesthésie par le froid, tandis qu'un conditionnement répété mais comportant un intervalle entre chaque cycle de conditionnement, permet de générer de la MLT, une mémoire consolidée qui est également résistante à l'anesthésie par le froid, mais qui contrairement à la MRA, est dépendante d'une néo synthèse protéique. Pour cette étude, nous avons analysé l'effet sur la mémoire olfactive de privations de 4 h de sommeil réalisées à différents moments après l'apprentissage. S'il a déjà été démontré qu'une privation de sommeil de 4 h est délétère pour la consolidation de la MLT dans le cadre du comportement de cour (Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006), aucune étude n'a à ce jour été réalisée en ce qui concerne la MRA.

2. Principaux Résultats

Les résultats de notre étude montrent qu'une privation de sommeil réalisée pendant la phase de consolidation produit un effet délétère sur le rappel de la MRA. La consolidation est sensible à une privation de sommeil se produisant sur une fenêtre située entre 4 et 16 h après la fin du conditionnement. De manière intéressante, le rappel mnésique n'est pas affecté si celui-ci a lieu en fin de journée, avant l'extinction des lumières. Cette période correspond à un pic naturel d'activité locomotrice des drosophiles qui anticipent ainsi l'extinction des lumières. Des résultats similaires sont observés en ce qui concerne le rappel de la MLT.

Nous avons également montré qu'en absence de rythme circadien (utilisation d'un mutant d'horloge ou de conditions expérimentales de jour constant), la consolidation de la mémoire est insensible à une privation de sommeil de 4 h. Ceci suggère que la consolidation de la mémoire est moins dépendante du sommeil chez des drosophiles arhythmiques.

Title:

Circadian Modulation of Consolidated
Memory Retrieval Following Sleep Deprivation in *Drosophila*

Subtitle:

Circadian Modulation and Sleep Requirement for Consolidated Memory

Eric Le Glou¹; Laurent Seugnet, PhD^{1,2}; Paul J. Shaw, PhD³; Thomas Preat, PhD¹;
Valérie Goguel, PhD¹

1) Genes and Dynamics of Memory Systems, Neurobiology Unit, CNRS, ESPCI,
10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

2) Integrative Physiology of Brain Arousal Systems, Lyon Neuroscience Research
Center, INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon 1,
8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon, France

3) Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University, 660 South
Euclid Avenue, St. Louis, Missouri, USA

Address correspondence to: Dr Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory
Systems, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France; Tel.: +33 (0)1 40 79 51 23;
Fax: +33 (0)1 40 79 52 29 ; e-mail: valerie.goguel@espci.fr

DISCLOSURE STATEMENT

This was not an industry supported study. The authors have indicated no financial
conflicts of interest.

Study Objectives: Several lines of evidence indicate that sleep plays a critical role in learning and memory. The aim of this study was to evaluate Anesthesia Resistant Memory following sleep deprivation in *Drosophila*.

Design: 4 to 16 h after aversive olfactory training, flies were sleep deprived for 4 h. Memory was assessed 24 h after training. Training, sleep deprivation and memory tests were performed at different times during the day to evaluate the importance of the time of day for memory formation. The role of circadian rhythms was further evaluated using circadian clock mutants.

Results: Memory is disrupted when flies are exposed to 4 h of sleep deprivation during the consolidation phase. Interestingly, normal memory is observed following sleep deprivation when the memory test is performed during the two hours preceding lights-off, a period characterized by maximum wake in flies. We also show that Anesthesia Resistant Memory is less sensitive to sleep deprivation in flies with disrupted circadian rhythms.

Conclusions: Our results indicate that Anesthesia Resistant Memory, a consolidated memory less costly than long-term memory, is sensitive to sleep deprivation. In addition, we provide evidence that circadian factors influence memory vulnerability to sleep deprivation and memory retrieval. Taken together, the data show that memories weakened by sleep deprivation can be retrieved if the animals are tested at the optimal circadian time.

Keywords: Sleep deprivation, Memory retrieval, Memory consolidation, Circadian rhythms, Activity peak, *Drosophila*, Recall, Clock mutant.

INTRODUCTION

The impact of sleep loss on memory processing is a well-documented phenomenon in human and mammalian models, indicating that sleep plays a critical role both in learning and in consolidation of newly acquired memories. In particular, sleep loss differentially affects various types of memories.¹ Studies in mice have examined the effect of 5 h of sleep deprivation following training in a fear-conditioning paradigm, and have shown that sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear but not cued fear.^{2,3} This demonstrates that sleep deprivation has a negative effect on memory consolidation, particularly when this process involves the hippocampus. Similar findings have been reported using spatial and non-spatial versions of the Morris water maze, showing that sleep deprivation selectively affects consolidation of hippocampus-dependent spatial memory.⁴⁻⁶ However, despite this knowledge, we still do not understand the role of sleep during memory consolidation. Elucidating the links between sleep, memory consolidation and neuronal processes necessitates an experimental system where ideally all those elements can be manipulated. *Drosophila* fulfills these conditions.

The *Drosophila* central nervous system is composed of neurons and glia that operate on the same fundamental principles as their mammalian counterparts. Even though the *Drosophila* brain contains only about 100,000 neurons,⁷ it is highly structured and sustains complex behaviors. Flies have been widely used for the analysis of circadian rhythms,⁸ the understanding of sleep mechanisms,⁹ and also to investigate the basis of learning and memory.¹⁰ Moreover, *Drosophila* studies can identify physiological processes that may eventually be generalized to other species, given the conserved repertoire of neuronal proteins between *Drosophila* and mammals.¹¹

Several paradigms have been developed to study learning and memory in *Drosophila*, such as courtship conditioning and olfactory appetitive or aversive conditioning. With the associative aversive olfactory protocol, two distinct types of consolidated memories can be formed following several training sessions. Anesthesia resistant memory (ARM) is generally assessed using a reinforced protocol comprising several consecutive training cycles, whereas long-term memory (LTM) is exclusively formed after several cycles each separated by a rest interval. ARM is resistant to cold anesthesia,¹² and both ARM and LTM last for days. Importantly, unlike ARM, LTM formation depends on *de novo* protein synthesis since

it is sensitive to a treatment by cycloheximide, an inhibitor of cytoplasmic protein synthesis.¹² Another study has confirmed that unlike ARM, LTM is an energetically costly process¹³ that is thought to require synaptic structural plasticity.¹⁴ Neural pathways underlying memory processing in flies are well identified: information is conveyed and integrated in the mushroom bodies (MBs), a symmetrical structure comprised of roughly 2,000 neurons on each side of the brain. Olfactory memories are believed to be stored in the output synapses of the MBs.^{15,16} Interestingly, key molecular pathways involved in memory processes such as the cAMP/PKA signaling pathway, are conserved from flies to mammals.¹⁷⁻¹⁹

Sleep in *Drosophila* exhibits many key similarities with mammalian sleep.²⁰ *Drosophila* sleep is characterized by periods of immobility (5 minutes and longer) associated with an increase in arousal threshold,^{21,22} changes in brain electrical activity,²³ homeostatic regulation after sleep deprivation,^{21,22} and changes in gene expression.^{24,25} Interestingly, several genes that affect sleep are involved in synaptic plasticity and show preferential expression in the MBs.⁹ In addition, altering MBs neuronal activity modifies sleep, indicating that MBs constitute an important center for sleep regulation as well as for memory processing/storage.^{26,27}

Several studies have provided evidence that learning and memory are sensitive to sleep deprivation in flies. It has been shown that 6 and 12 h of sleep deprivation disrupts learning, as evaluated with an aversive phototactic suppression protocol, showing extensive homology in sleep-deprivation-induced learning impairment between flies and mammals.²⁸ Flies with mutations reducing sleep also show short-term memory (STM) defect in another operant paradigm, heat box conditioning.²⁹ Li *et al.*³⁰ reported that submitting flies to 24 h of sleep deprivation before conditioning is deleterious for short-term (1 h) olfactory aversive memory formation. Moreover, a 4 h sleep deprivation applied anytime from 0 to 8 h after the end of the conditioning leads to a 48 h courtship LTM defect,³¹ indicating that sleep is necessary for memory consolidation. More recently, it has been shown that the induction of sleep can facilitate the formation of LTM.³² Altogether, these studies demonstrate sleep requirement for learning, STM and LTM consolidation.

Because ARM is believed to be a less energetically costly process than LTM, it could be expected to exhibit sleep requirement distinct from that required during LTM formation. The present study addresses this question and demonstrates that 4 h of sleep deprivation during aversive olfactory memory consolidation severely

impacts ARM. The data show that memory is noticeably affected at the level of the retrieval step, as the detrimental effect of sleep deprivation can be compensated when memory retrieval takes place during a fly waking peak that naturally occurs around day/night transitions. In addition, our data show that memory becomes insensitive to 4 h of sleep deprivation when circadian rhythms are disrupted, indicating that the circadian clock modulates the influence of sleep on consolidated memory.

METHODS

Fly Stocks

Drosophila melanogaster wild-type strain Canton-Special was raised at 18°C with 60% humidity in a 12 h:12 h Light-Dark (LD) cycle (Lights-on at zeitgeber time 0 (ZT0) = 8 am) on a standard food containing yeast, cornmeal and agar. *per^S* and *per^O* mutant flies³³ were obtained from F. Rouyer (INAF, CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Light was provided by standard white fluorescent low-energy bulbs. Light intensity at flies level was around 250 lux.

Olfactory conditioning and Behavioral analysis

1-2 days old flies were transferred in new vials 3-4 days prior to training. For aversive training, flies were conditioned by an odor paired with electric shocks and subsequent exposure to a second odor in the absence of shock, as previously described.³⁴ For massed training, flies received five training cycles delivered one right after the other, while for spaced training, flies received five training cycles with 15 min rest intervals. Conditioning was performed with groups of 40–50 flies using 3-octanol (>95% purity; Fluka 74878, Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol (99% purity; Fluka 66360, Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International, Sigma-Aldrich). Conditioning and testing were performed at 25°C with 80% humidity. Otherwise, flies were kept at 18°C with 60% humidity. After conditioning, female flies were individually placed, without CO₂ anesthesia, into 65-mm glass tubes (5-mm diameter) containing food, and sleep was evaluated using the Trikinetics activity monitoring system²² (www.trikinetics.com). 2 h before the memory test, flies were transferred to vials with food in groups of 16 flies. Memory tests were performed with a T-maze apparatus as

previously described.³⁵ Flies could choose for 1 min between two arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the sum of flies in both arms. The Performance Index (PI) results from the average of two reciprocal experiments so that a 50:50 distribution (no memory) yields a PI of zero. For Light-Light (LL) analyses, flies were raised in LD condition and placed in LL from emergence until the end of the experiment. In parallel to each experiment, wild-type flies in regular bottles were conditioned and used as internal controls (data not shown). Each average data results from a minimum of three independent experiments.

As described previously,^{22,36} periods of immobility lasting at least 5 min were defined as sleep and were computed using an excel software macro from P.J. Shaw laboratory.

Sleep deprivation

Flies were sleep-deprived using the Sleep Nullifying Apparatus (SNAP), an automated sleep deprivation apparatus that has been found to keep flies awake without non-specifically activating stress responses.³⁷ SNAP tilted asymmetrically from -60° to $+60^\circ$ such that sleeping flies were displaced during the downward movement 3 times per 30 seconds. During the 4 h of sleep deprivation, the SNAP was “on” during 30 sec each 5 min. For the stimulation control, flies were submitted to mechanical stimulation during 12 min per hour. During these 12 min, the SNAP was “on” during 30 sec each minute. This stimulation was applied during 4 h to mimic the sleep deprivation protocol. Thus, flies were submitted to the same amount of mechanical stimulation as during the sleep deprivation protocol but during a shorter period. Flies were able to sleep up to 48 min per hour during those 4 h.

To estimate the quantity and quality of sleep lost during the sleep deprivation, the total amount of sleep was calculated for undisturbed conditioned control flies during the same period as sleep deprivation of the sleep-deprived groups.

Statistical analyses

All average data are presented as mean \pm SEM and compared with two-tailed unpaired *t*-tests. Tests were performed using Prism (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Sleep requirement during ARM consolidation

To evaluate whether sleep is required for ARM processing, we analyzed ARM performance of wild-type flies sleep-deprived during the memory consolidation phase. For that purpose, groups of flies were first trained in the morning, zeitgeber time 2 (ZT2), with 5 massed-cycle conditioning (massed training). Then half of the flies was transferred to trikinetics tubes and left there without perturbation (control group), while the other half was transferred to trikinetics tubes and submitted to 4 h of sleep deprivation. Given the time required to transfer each fly in individual tubes after the training, and to insure synchronicity of treatment for all the flies, the sleep deprivation was scheduled 4 h after conditioning. When the sleep deprivation treatment was applied for 4 h at ZT8, we observed that memory scores of sleep-deprived groups were significantly lower than that of control groups (Figure 1A). Wild-type flies are predominantly awake during the hours preceding lights-off.³⁸ However, trained flies obtained on average 148 ± 10 min of sleep from ZT8 to ZT12 (Figure S1A). Interestingly, trained flies exhibited significantly more sleep than naïve flies, indicating that conditioning treatment led to an increase in sleep (Figure S1A). Thus, trained flies experienced a substantial amount of sleep during the 4 h preceding lights-off, while sleep-deprived flies were maintained awake during the same period. Following sleep deprivation, the quantity of sleep as well as its quality, as measured by mean bout duration, were similar to that observed in non-sleep deprived flies, and did not show detectable evidence of a sleep homeostatic response, may be due to the relative low level of sleep lost (Figure S1B).

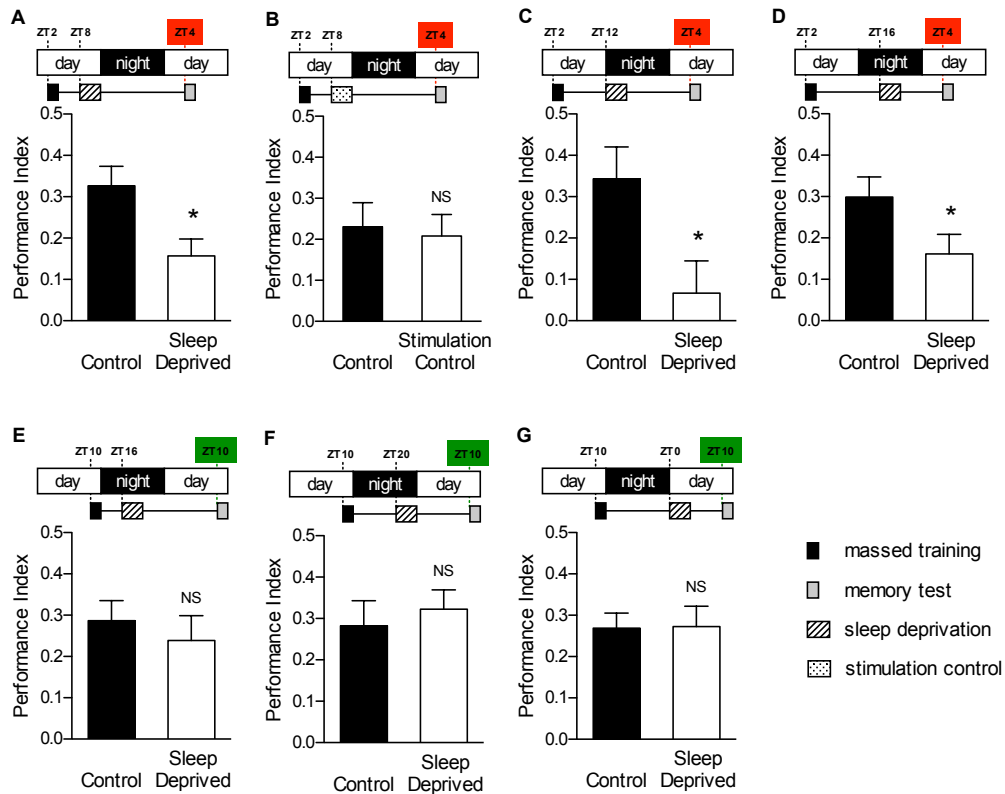


Figure 1: Effect of sleep deprivation during ARM consolidation.

Wild-type flies were trained with 5 massed cycles, either sleep-deprived or submitted to a mechanical control, and tested at times indicated in the cartoon above each graph. Control groups correspond to flies in trikinetics tubes without any perturbation. **(A,C,D)** Sleep deprivations from 4 to 16 h after the end of the conditioning disrupts ARM when training and testing occur in the morning ($n \geq 12$). **(B)** Mechanical control, flies received the same amount of mechanical stimulation as during the sleep deprivation, but over a shorter period (see Methods). Flies exhibit a normal ARM ($n = 12$). We note that the memory score generated by the control groups is lower than in the previous experiment, due to common variability in behavior experiments. **(E,F,G)** Sleep deprivations from 4 to 16 h after the end of the conditioning do not disrupt ARM scores when training and testing occur in the evening (ZT10) ($n \geq 12$). Data are mean PI \pm SEM. Unpaired t -test; NS, not significant ($P > 0.05$); * ($P < 0.05$).

Sleep-deprived and control flies displayed similar amounts of sleep at the time of the test from ZT4 to ZT5 (41.5 ± 4.5 min and 38.8 ± 4.3 min, respectively; t -test; $n = 12$; $P = 0.78$), thus, increased sleepiness during the test is an unlikely explanation for the memory defects observed in sleep-deprived flies. Moreover, it has been shown that flies can recover normal cognitive performance in as little as 2 h following 12 h of sleep deprivation.²⁸

Several reports have shown that memory and learning defects induced by sleep deprivation are not caused by the stress produced by the mechanical

perturbation used during the sleep deprivation protocol.^{30,31} To formally exclude that a stress induced by the sleep deprivation protocol could be responsible for the observed memory impairment, we performed a stimulation control. Flies were submitted to the same amount of mechanical stimulation as during the 4 h sleep deprivation protocol, but during a shorter period of time. Importantly, unlike the sleep deprivation protocol, this control treatment allowed flies to rest and sleep during 48 min per hour. Flies submitted to this protocol showed memory scores similar to that of the undisturbed groups (Figure 1B). Taken together, the results strongly suggest that the memory defect observed in Figure 1A experiment is specifically caused by sleep disruption.

To further determine the window during which ARM consolidation is dependent on sleep, we delayed the beginning of sleep deprivation to either 8 h or 12 h after the end of the conditioning. In both cases, we observed a 24 h ARM defect (Figure 1C,D). Sleep monitoring revealed that at ZT12-16 and ZT16-20, trained flies experienced 220 ± 4 min and 219 ± 5 min of sleep, respectively, amounts significantly higher than that observed in naïve flies (Figure S1A). Moreover, following treatment, sleep-deprived flies exhibited an increase in the amount and quality of sleep compared to control flies (Figure S1C), indicating a sleep homeostatic response.

Altogether the data indicate that ARM, a consolidated memory form that does not rely on *de novo* protein synthesis, is sensitive to 4 h of sleep deprivation occurring in a time window ranging from 4 to 16 h after conditioning.

The time of day influences ARM performance after sleep deprivation

Because *Drosophila* olfactory learning can be influenced by the time of day,³⁹ we next sought to evaluate whether circadian rhythms could influence ARM performance after sleep deprivation. For that purpose, training sessions were performed at the end of the lights-on period (evening), ZT10 (Figure 1E,F,G), instead of ZT2 (morning) (Figure 1A,C,D). Flies were then sleep-deprived for 4 h starting at ZT16, and tested for memory retrieval at ZT10 the next day. Strikingly, sleep-deprived flies did not show any significant memory impairment (Figure 1E). Similar results were observed when the sleep deprivation window was shifted to either ZT20 or ZT0 (Figure 1F,G). Thus, flies conditioned and further tested in the evening exhibit a memory performance that is not affected by sleep deprivation, suggesting that

performance after sleep deprivation is modulated by circadian rhythms.

Memory retrieval is modulated by the circadian cycle in sleep-deprived flies

To determine whether conditioning and/or testing in the evening was responsible for the loss of ARM sensitivity to sleep deprivation, flies were submitted to sleep deprivation after conditioning performed at ZT10, but were tested for retrieval at ZT6, 20 h later, instead of 24 h (Figure 2A). In that case, sleep-deprived flies displayed a ARM impairment (Figure 2A). This defect was not correlated to the sleep deprivation time window, as we obtained similar results with a sleep deprivation taking place 4 h later (Figure 2B), indicating that ARM performance defects following sleep deprivation depends on when retrieval takes place. The shorter time interval between the end of the sleep deprivation and the retrieval test is unlikely to cause the impairment as we have observed in our initial set of experiments that a 6 h interval between sleep deprivation and testing does not lead to performance impairment (Figure 1G).

To confirm these results, we next performed the opposite experiment, namely a conditioning at ZT6, and a memory test taking place either 24 h later at ZT6 (Figure 2C), or 28 h later at ZT10 (Figure 2D). In other words, experiments were identical except for the time of test. Strikingly, flies tested at ZT6 displayed a memory defect (Figure 2C), while flies tested at ZT10 exhibited scores comparable to that of control flies (Figure 2D).

When flies were tested at ZT10, the end of the light phase, they had more lights-on time to possibly recover from sleep deprivation. To exclude the possibility that the longer recovery period might account for the absence of memory deficits, we applied a second sleep deprivation before the test, from ZT4 to ZT8 (Figure 2E). Interestingly, flies that were sleep-deprived twice exhibited normal memory scores when memory was tested at ZT10, indicating that increased opportunity to sleep was not responsible for better memory scores. We conclude that when the memory test occurs at the end of the light phase, ARM performance does not appear to be affected by a previous sleep deprivation.

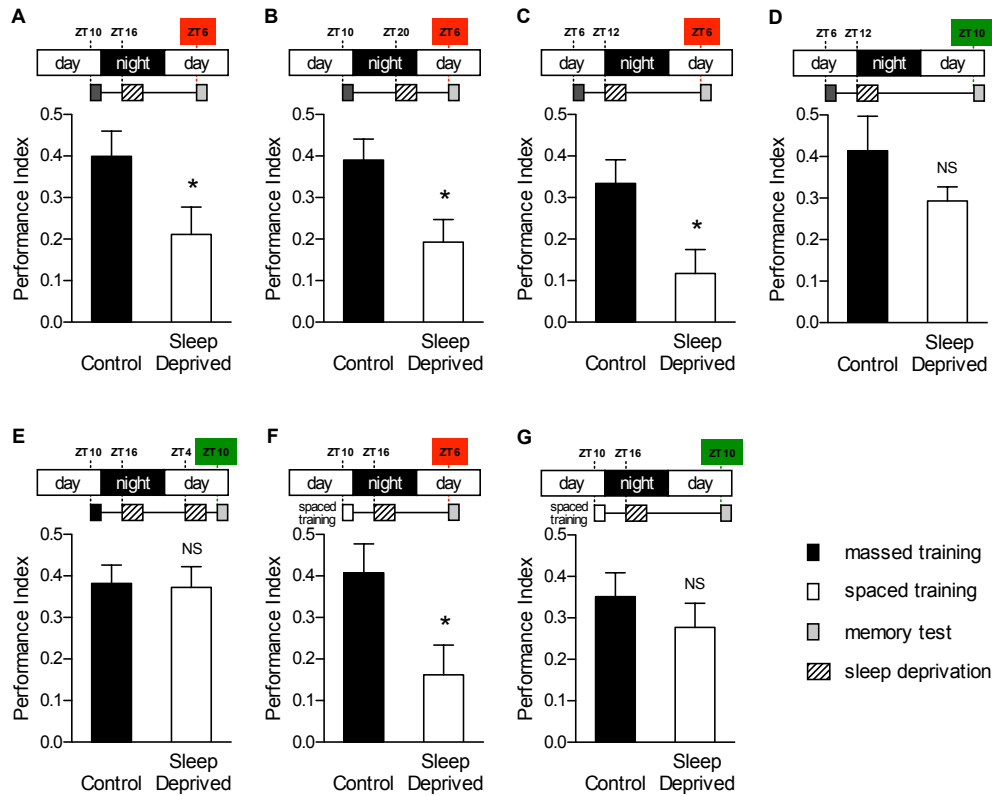


Figure 2: The time of day affects memory retrieval following sleep deprivation. (A,B,C,D,E) Wild-type flies were trained with 5 massed cycles for ARM analyses. (A,B) Flies sleep-deprived for 4 h and tested 20 h after training (ZT6) exhibit a memory impairment compared to control groups ($n \geq 14$). (C) Flies sleep-deprived for 4 h and tested 24 h after training (ZT6), exhibit a memory impairment compared to control groups ($n = 12$). (D) Flies sleep-deprived for 4 h and tested 28 h after training (ZT10) display a wild-type ARM ($n = 12$). (E) Flies were sleep-deprived twice. A first sleep deprivation was applied from ZT16 to ZT20, and a second one the next day from ZT4 to ZT8. Flies were tested for memory performance at ZT10. Sleep-deprived flies exhibit memory scores indistinguishable from control flies ($n = 11$). (F,G) Flies were trained with 5 spaced cycles for LTM analyses. (F) Flies sleep-deprived for 4 h and tested 20 h after training (ZT6) exhibit a memory impairment compared to control groups ($n = 9$). (G) Flies sleep-deprived for 4 h and tested 24 h after training (ZT10) display a wild-type LTM ($n = 12$, $P > 0.05$). Data are mean PI \pm SEM. Unpaired t -test; NS, not significant ($P > 0.05$); * ($P < 0.05$).

As memory retrieval seems to be facilitated in the evening, one could expect that flies without sleep deprivation display higher memory scores when tested during this period (ZT10) rather than in the morning (ZT4). This is not the case as we observed similar scores for all memory tests performed at ZT4 compared to that performed at ZT10 ($PI_{(ZT4; n=58)} = 0.30 \pm 0.03$ and $PI_{(ZT10; n=56)} = 0.31 \pm 0.03$; t -test: $P > 0.05$).

We next examined whether a circadian modulation of memory performance following sleep deprivation also applies to LTM, the other form of consolidated memory described in flies. Flies were submitted to a 5 spaced-cycle conditioning, a protocol known to generate LTM, then sleep-deprived 4 h later for 4 h, and tested for memory retrieval either at ZT6 or at ZT10. When memory retrieval tests were performed at ZT6, we observed a LTM-impairment (Figure 2F), whereas in sharp contrast, flies displayed wild-type memory scores when tested at ZT10 (Figure 2G). These results suggest that, similar to ARM, LTM retrieval is affected by a sleep-deprivation taking place during the consolidation phase, except when memory retrieval occurs in the 2 h before lights-off.

Sleep deprivation does not disrupt ARM in arrhythmic flies

To further investigate the circadian modulation of ARM vulnerability to sleep deprivation, we evaluated *per*⁰ mutant flies which have been shown to lack circadian clock.^{33,40-43} As previously observed, *per*⁰ flies did not anticipate the light-dark transition, but appeared to sleep less in the presence of light, and more in its absence (Figure S2A). Because *per*⁰ mutant exhibits LTM courtship defect,⁴⁴ we first checked 24 h memory after massed training. *per*⁰ flies exhibited normal performance (Figure S3A). Interestingly, when *per*⁰ flies reared under LD condition were trained using massed training and then submitted to a 4 h sleep deprivation, they displayed normal scores no matter the training/testing time (Figure 3A,B). These results cannot be explained by a reduction in the amount of sleep lost during sleep deprivation, as quantification revealed that *per*⁰ flies (Figure 3A) lost slightly more sleep than wild-type flies sleep deprived at the same time of the day (Figure 1A) (175 ± 2 min vs 166 ± 3 min; *t*-test; *n* = 384; *P* = 0.0041). Moreover, the quality of removed sleep was similar in these two conditions as mean average sleep bout duration was 36.0 ± 2.3 min for wild-type in LD vs 33.5 ± 2.1 min for *per*⁰ flies (*t*-test; *n* = 384; *P* > 0.05). Sleep deprived *per*⁰ flies did not obtain more sleep than undisturbed flies in the hours preceding the test (ZT0-4) (Figure S4A). In addition, we observed similar locomotor activity in sleep-deprived *per*⁰ and sleep-deprived wild-type flies at ZT4, the moment of the memory test (Figure S4B). Thus, increased sleep or activity does not explain the lack of memory deficits in sleep-deprived *per*⁰ mutants. In conclusion, ARM is not sensitive to a 4 h sleep deprivation taking place during the consolidation phase in *per*⁰ mutant flies.

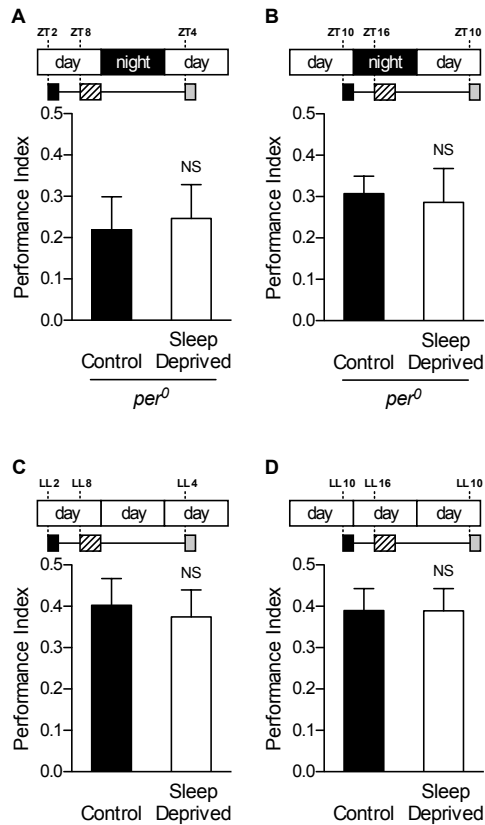


Figure 3: 4 h of sleep deprivation does not disrupt ARM in arrhythmic flies.

Flies were conditioned with 5 massed cycles and submitted to a 4 h sleep-deprivation 4 h later. **(A,B)** *per*⁰ mutant flies. When *per*⁰ flies were either trained and tested in the morning, or trained and tested in the evening (ZT10), sleep-deprived groups showed no memory impairment ($n \geq 11$). **(C,D)** Wild-type flies in constant light (LL). Wild-type flies were raised in LD cycles and placed in LL condition from emergence to the memory test. When flies were sleep-deprived 4 h after the end of massed training, ARM was not disturbed ($n \geq 11$). Data are mean PI \pm SEM. Unpaired *t*-test; NS, not significant ($P > 0.05$).

To further evaluate the impact of circadian rhythms on consolidated memory retrieval, we next disrupted the circadian clock by placing wild-type flies in constant light (LL).^{38,45,46} Under LL condition, flies were arrhythmic with respect to sleep pattern (Figure S2B), and able to form 24 h memory after massed training (Figure 3C,D). We next evaluated ARM after massed-training either at LL2 or LL10, followed by a sleep deprivation taking place 4 h later (Figure 3C,D). Memory tests performed 24 h later revealed that, similar to *per*⁰ flies, wild-type LL flies showed normal memory retrieval after sleep deprivation (Figure 3C,D). Again, these results cannot be explained by a reduction in the amount of sleep lost, as flies in LL lost more sleep during the sleep deprivation (Figure 3C) than flies kept in LD and sleep deprived at

ZT8 (Figure 1A) (183 ± 2 min vs 166 ± 3 min; *t*-test; $n = 384$; $P < 0.0001$). Moreover, the quality of removed sleep was similar in these two conditions as mean average sleep bout duration was 36.0 ± 2.3 min for wild-type in LD vs 36.7 ± 2.1 min for wild-type in LL (*t*-test; $n = 384$; $P > 0.05$). Taken together, the results indicate that disruption of circadian rhythms reduces sleep requirement for ARM.

ARM performance after sleep deprivation is modulated by the evening waking peak

The circadian clock modulates the intensity of locomotor activity throughout the day, driving notably well-identified morning and evening peaks of activity and wake, the former occurring after lights-on, and the latter a couple of hours before lights-off.^{38,47,48} To assess the role of the evening waking peak during memory retrieval, we used *per^S* mutant flies.³³ Under LD condition, *per^S* flies displayed an evening waking peak occurring 4 h earlier than that observed in wild-type flies (Figure S2C), due to a shorter circadian period (19 h).³³ We first checked that *per^S* mutant displayed normal 24 h memory (Figure S3B). Next, *per^S* mutant flies underwent massed-training and were submitted to a 4 h sleep deprivation 4 h later. Strikingly, *per^S* flies exhibited a memory deficit when the training/testing occurred at ZT10 (Figure 4A), unlike wild-type flies (Figure 1E). In sharp contrast, when the testing occurred at ZT6, during their waking peak, *per^S* flies exhibited memory scores that were not significantly different from the control (Figure 4B). Because we raised flies at 18°C, we could not assess the role of the morning activity peak as low temperatures have been shown to inhibit this activity peak.⁴⁹ In conclusion, the results show that when memory retrieval takes place during the circadian waking peak, memory retrieval is not affected by a sleep deprivation during the consolidation phase.

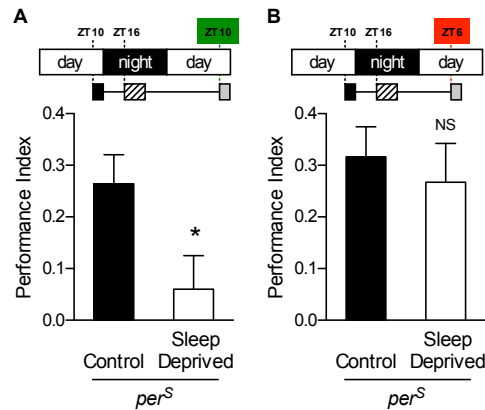


Figure 4: Positive correlation between memory retrieval after sleep deprivation and the evening activity peak.

per^S mutant flies were trained with 5 massed cycles in the evening (ZT10) and sleep deprived 4 h after conditioning. **(A)** When tested for memory at ZT10, sleep-deprived *per^S* flies exhibit a significant defect ($n = 12$). **(B)** When tested at ZT6, sleep-deprived *per^S* flies show a wild-type ARM ($n \geq 11$). Data are mean PI \pm SEM. Unpaired *t*-test; NS, not significant ($P > 0.05$); * ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Our results demonstrate that 4 h of sleep deprivation during the consolidation phase affects aversive olfactory ARM and LTM, showing the importance of sleep for distinct types of memory. When memory retrieval occurs during the evening waking peak however, normal performance is observed after sleep deprivation, suggesting that circadian factors modulate the amplitude of the observed sleep deprivation induced deficits. Interestingly, we show that disruption of the circadian clock reduces sleep requirement during consolidation.

Ganguly-Fitzgerald *et al.* previously showed that 4 h of sleep deprivation 4 h after conditioning induces a LTM courtship defect.³¹ LTM relies on transcriptome changes and *de novo* protein synthesis, probably mediating synaptic plasticity. Despite the fact that ARM is a consolidated memory form that is less energetically costly than LTM, we show here that this process does also require sleep, suggesting a requirement for sleep-induced synaptic plasticity. It is known that LTM consolidation is a long process occurring from 0 to at least 24 h after conditioning, observed as changes in gene expression⁵⁰ and the identification of specific memory traces.⁵¹ In contrast, very little data is available about ARM consolidation. Our results suggest that ARM consolidation is also a long process as sleep deprivation starting 12 h after training leads to memory impairment. Whether or not ARM and LTM rely

on the same or unrelated sleep dependent processes for their consolidation remains to be investigated. One interesting pathway in that regards is the cAMP signaling cascade which plays a key role in all those processes.^{19,52,53}

In *Drosophila* as in mammals, memory performance can be modulated by circadian factors. In fly, learning achieved by association of an odor with the delivery of a single electric shock has been shown to be more robust during the early night (ZT13).³⁹ In the present study however, flies were conditioned either at ZT2, 6 or 10, several hours away from the optimum learning window defined by Lyons and Roman. In addition, our results show that memory performance of the sleep-deprived flies was modulated by the testing time and not by the learning time.

It is well-known that flies sleep less and exhibit a locomotor activity peak 2-3 h prior lights-off as they anticipate night. Here, we show that testing memory performance during this activity and waking peak can compensate for the detrimental effect of sleep deprivation during the consolidation phase. Similar results were obtained for LTM processing, suggesting that similar mechanisms might link memory retrieval and circadian rhythms for both ARM and LTM. Importantly, we can exclude that memory scores are modulated by a change in sensory perception. Indeed, it has been shown that olfactory responses in wild-type flies peak during the middle of the night, and that there is no variation between midday and evening.⁵⁴ Moreover, this peak does not correlate with the locomotor activity peak,⁵⁵ ruling out that an increased sensory perception might account for normal memory performance after sleep deprivation when retrieval is achieved in the evening.

Memories are not acquired in their definitive form, but undergo a gradual process of stabilization over time. Sleep is believed to play a role in progressively increasing the strength and stability of connections that represent the original experience.^{56,57} It seems unlikely that a sleep deprivation during the consolidation phase, and ending from 8 to 16 h before the memory test, would affect only the retrieval step. Rather, we suggest that our data reveal two phenomenon: i) a consolidation phase that is affected by a sleep deprivation, pointing to a role for sleep in that process, and ii) a memory retrieval that is modulated by the time of day, pointing to a role for circadian rhythms in that process. Thus, one could hypothesize that if flies are sleep-deprived during the memory consolidation phase, there might be a deficit in the consolidation and/or selection of connections relevant to memory, so that it is more difficult for the animal to retrieve the appropriate information.

However, memory retrieval might occur more efficiently during the fly activity peak, thus bypassing the detrimental effect caused by the sleep deprivation; revealing an interaction between the consolidation and retrieval steps. We do not know whether the circadian modulation relies on the clock mechanisms per se, or maybe more likely, on a general brain state of alert flies that would facilitate memory retrieval.

Circadian rhythms are basic biological phenomena that exist throughout phylogeny. Studies in several species have shown that disruption of circadian rhythms has negative consequences on memory.⁵⁸ Unexpectedly, disrupting the fly circadian clock with either LL condition or the *per⁰* mutation does not affect 24h-ARM, and moreover, the generated memory is not sensitive to 4 h of sleep deprivation during the consolidation phase. As mentioned above, this is not attributable to a change in either sleep architecture or general activity during the memory test. Rather, the results indicate a lower sleep-requirement for ARM when circadian rhythms are disrupted. It is possible that the lack of circadian clock relaxes time constraints on sleep dependent synaptic processes and renders memory consolidation less sensitive to sleep disruption. Nevertheless, *per⁰* flies display a sleep homeostatic response and performance impairments following sleep deprivation, as wild-type flies.^{37,59} While sleep homeostatic regulation can occur in the absence of a functional circadian clock, the study of clock mutants such as *tim⁰¹* and *cyc⁰¹* indicate that the homeostatic response and thus potentially sleep requirements can be positively or negatively modulated by molecular components of the clock.^{21,22,37}

In conclusion, this work points toward a correlation between circadian rhythm and sleep requirement for consolidated memories. Elucidating how the circadian clock influences sleep requirements and memory retrieval is clearly a complex issue that will require further investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank François Rouyer (INAF, CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for helpful comments during this work, and for providing the *per⁰* and *per^S* lines. We also thank members of the Genes and Dynamics of Memory Systems group for critical reading of the manuscript. E.L.G. was supported by a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement, and L.S. by a fellowship from the Fondation Pierre-Gilles de Gennes.

REFERENCES

1. Wang G, Grone B, Colas D, Appelbaum L, Murrain P. Synaptic plasticity in sleep: learning, homeostasis and disease. *Trends Neurosci* 2011;34:452-63.
2. Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem* 2003;10:168-76.
3. Vecsey CG, Baillie GS, Jaganath D, et al. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. *Nature* 2009;461:1122-5.
4. Smith C, Rose GM. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol Behav* 1996;59:93-7.
5. Smith C, Rose GM. Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1997;111:1197-204.
6. Hairston IS, Little MT, Scanlon MD, et al. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *J Neurophysiol* 2005;94:4224-33.
7. Ito K, Okada R, Tanaka NK, Awasaki T. Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microsc Res Tech* 2003;62:170-86.
8. Peschel N, Helfrich-Forster C. Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 2011;585:1435-42.
9. Bushey D, Cirelli C. From genetics to structure to function: exploring sleep in *Drosophila*. *Int Rev Neurobiol* 2011;99:213-44.
10. Kahsai L, Zars T. Learning and memory in *Drosophila*: behavior, genetics, and neural systems. *Int Rev Neurobiol* 2011;99:139-67.
11. Littleton JT, Ganetzky B. Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 2000;26:35-43.
12. Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 1994;79:35-47.
13. Mery F, Kawecki TJ. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 2005;308:1148.
14. Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 1993;55:397-426.
15. McGuire SE, Le PT, Davis RL. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 2001;293:1330-3.
16. Isabel G, Pascual A, Preat T. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 2004;304:1024-7.
17. Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7041-6.
18. Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 1998;5:365-74.
19. Perazzona B, Isabel G, Preat T, Davis RL. The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *J Neurosci* 2004;24:8823-8.
20. Greenspan RJ, Tononi G, Cirelli C, Shaw PJ. Sleep and the fruit fly. *Trends Neurosci* 2001;24:142-5.
21. Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, et al. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 2000;25:129-38.

22. Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000;287:1834-7.
23. van Swinderen B, Nitz DA, Greenspan RJ. Uncoupling of brain activity from movement defines arousal States in *Drosophila*. *Curr Biol* 2004;14:81-7.
24. Cirelli C, LaVaute TM, Tononi G. Sleep and wakefulness modulate gene expression in *Drosophila*. *J Neurochem* 2005;94:1411-9.
25. Zimmerman JE, Rizzo W, Shockley KR, et al. Multiple mechanisms limit the duration of wakefulness in *Drosophila* brain. *Physiol Genomics* 2006;27:337-50.
26. Joiner WJ, Crocker A, White BH, Sehgal A. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* 2006;441:757-60.
27. Pitman JL, McGill JJ, Keegan KP, Allada R. A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* 2006;441:753-6.
28. Seugnet L, Suzuki Y, Vine L, Gottschalk L, Shaw PJ. D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in *Drosophila*. *Curr Biol* 2008;18:1110-7.
29. Bushey D, Huber R, Tononi G, Cirelli C. *Drosophila* Hyperkinetic mutants have reduced sleep and impaired memory. *J Neurosci* 2007;27:5384-93.
30. Li X, Yu F, Guo A. Sleep deprivation specifically impairs short-term olfactory memory in *Drosophila*. *Sleep* 2009;32:1417-24.
31. Ganguly-Fitzgerald I, Donlea J, Shaw PJ. Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science* 2006;313:1775-81.
32. Donlea JM, Thimman MS, Suzuki Y, Gottschalk L, Shaw PJ. Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in *Drosophila*. *Science* 2011;332:1571-6.
33. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:2112-6.
34. Pascual A, Preat T. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 2001;294:1115-7.
35. Tully T, Quinn WG. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 1985;157:263-77.
36. Andretic R, Shaw PJ. Essentials of sleep recordings in *Drosophila*: moving beyond sleep time. *Methods Enzymol* 2005;393:759-72.
37. Shaw PJ, Tononi G, Greenspan RJ, Robinson DF. Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila*. *Nature* 2002;417:287-91.
38. Hamblen-Coyle MJ, Wheeler DA, Rutila JE, Rosbash M, Hall JC. Behavior of period-altered circadian rhythm mutants of *Drosophila* in light: Dark cycles (Diptera: Drosophilidae) *J Insect Behav* 1992;5:417-46.
39. Lyons LC, Roman G. Circadian modulation of short-term memory in *Drosophila*. *Learn Mem* 2009;16:19-27.
40. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 1990;343:536-40.
41. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 1994;263:1603-6.
42. Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MP, Young MW. Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 1995;270:808-10.
43. Hunter-Ensor M, Ousley A, Sehgal A. Regulation of the *Drosophila* protein

- timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 1996;84:677-85.
44. Sakai T, Tamura T, Kitamoto T, Kidokoro Y. A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16058-63.
 45. Konopka RJ, Pittendrigh C, Orr D. Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J Neurogenet* 1989;6:1-10.
 46. Power JM, Ringo JM, Dowse HB. The effects of period mutations and light on the activity rhythms of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 1995;10:267-80.
 47. Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS, Hall JC. Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J Biol Rhythms* 1993;8:67-94.
 48. Helfrich-Forster C. Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster*--sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J Biol Rhythms* 2000;15:135-54.
 49. Zhang Y, Liu Y, Bilodeau-Wentworth D, Hardin PE, Emery P. Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Curr Biol* 2010;20:600-5.
 50. Dubnau J, Chiang AS, Grady L, et al. The staufer/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 2003;13:286-96.
 51. Yu D, Akalal DB, Davis RL. *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* 2006;52:845-55.
 52. Hendricks JC, Williams JA, Panckeri K, et al. A non-circadian role for cAMP signaling and CREB activity in *Drosophila* rest homeostasis. *Nat Neurosci* 2001;4:1108-15.
 53. Horiuchi J, Yamazaki D, Naganos S, Aigaki T, Saitoe M. Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20976-81.
 54. Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1999;400:375-8.
 55. Zhou X, Yuan C, Guo A. *Drosophila* olfactory response rhythms require clock genes but not pigment dispersing factor or lateral neurons. *J Biol Rhythms* 2005;20:237-44.
 56. Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 2006;10:49-62.
 57. Bushey D, Tononi G, Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: structural evidence in *Drosophila*. *Science* 2011;332:1576-81.
 58. Gerstner JR, Yin JC. Circadian rhythms and memory formation. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:577-88.
 59. Thimgan MS, Suzuki Y, Seugnet L, Gottschalk L, Shaw PJ. The perilipin homologue, lipid storage droplet 2, regulates sleep homeostasis and prevents learning impairments following sleep loss. *PLoS Biol* 2010;8.

SUPPLEMENTARY DATA

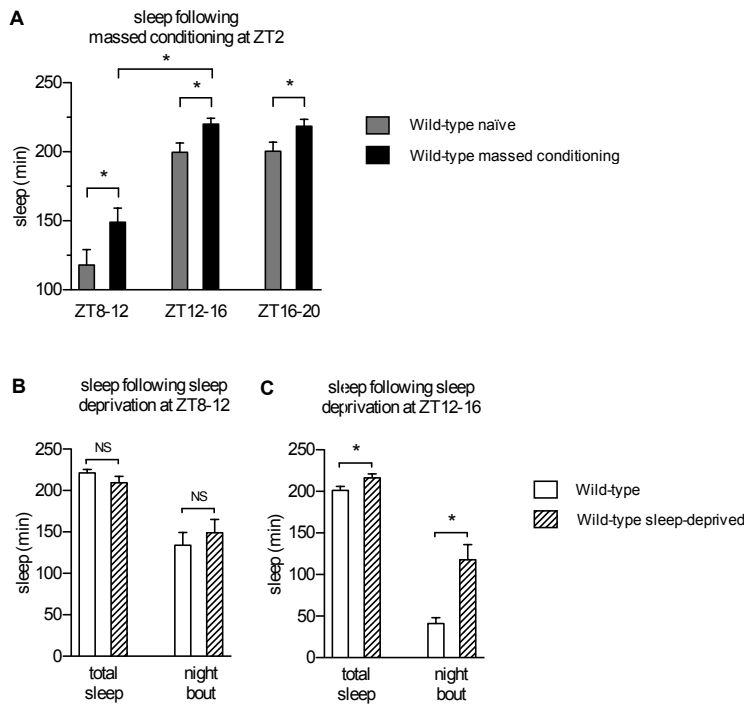


Figure S1: Sleep analyses.

(A) Sleep analyses in flies trained with massed conditioning protocol at ZT2. Total amount of sleep was monitored during the 4 h-windows corresponding to the different time-windows used to apply sleep deprivation in naïve wild-type flies (gray bar) and in trained flies (black bar). Conditioning induces an increase in total sleep (ZT8-12, 26% ; ZT12-16, 11% and ZT16-20, 11% ; $n = 32$). **(B,C)** Sleep quantification in the 4 h following the sleep deprivation treatment. Hatched bars: sleep-deprived flies; white bars: flies kept in trikinetics tubes without any perturbation. **(B)** Sleep deprivation applied from ZT8 to ZT12 does not induce any change in either sleep quantity or sleep quality ($n = 32$). **(C)** Sleep deprivation applied from ZT12 to ZT16 induces an increase in sleep quantity and quality ($n = 32$). Data are mean \pm SEM. Unpaired t -test; NS, not significant ($P > 0.05$), * ($P < 0.05$).

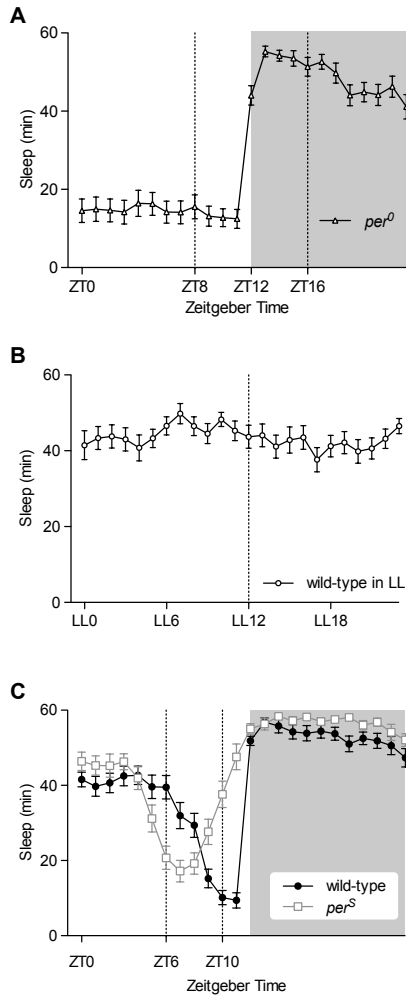


Figure S2: Sleep pattern analyses.

(A) *per⁰* mutant flies in LD cycles. Daily sleep patterns (min/h) ($n = 32$). *per⁰* flies show no circadian regulation of sleep behavior beyond the fact that they sleep less during the day due to light exposure. **(B)** Wild-type flies in constant light (LL). Daily sleep patterns (min/h) ($n = 32$). Wild-type flies show no circadian regulation of sleep behavior. **(C)** Daily sleep patterns (min/h) in LD cycles for wild-type ($n = 32$) and *per^S* ($n = 32$) flies. Wild-type flies sleep less around ZT10, whereas *per^S* mutant flies sleep less around ZT6. Data are mean \pm SEM.

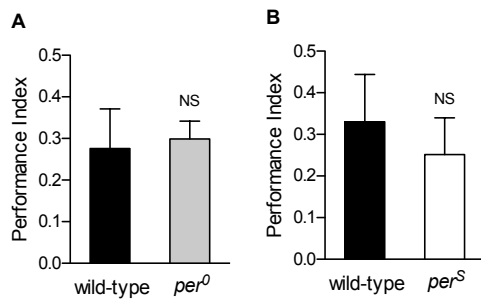


Figure S3: Circadian mutants exhibit normal ARM.

1-2 days old flies were trained with 5 massed cycles and tested for memory 24 h later. **(A)** *per⁰* mutant flies exhibit normal scores ($n \geq 9$). **(B)** *per^S* mutant flies exhibit normal scores ($n \geq 7$). Data are mean \pm SEM. Unpaired *t*-test; NS, not significant ($P > 0.05$).

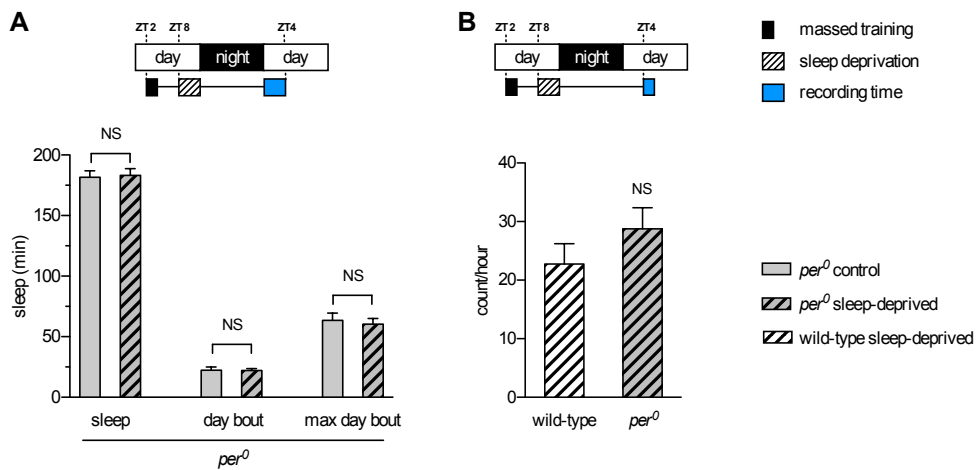


Figure S4: Sleep and locomotor activity in sleep-deprived *per⁰* flies.

Flies were trained with massed conditioning protocol at ZT2. **(A)** Sleep was monitored in *per⁰* flies that were either sleep-deprived from ZT8 to ZT12 or kept undisturbed. Sleep deprivation did not induce any change in either sleep quantity or sleep quality during the first 4 h of the light period ($n = 32$). **(B)** Wild-type and *per⁰* flies were sleep-deprived from ZT8 to ZT12 and locomotor activity was monitored from ZT4 to ZT6 the next day (count/hour: number of infrared beam breaks per h). *per⁰* flies did not show any increase in locomotor activity compared to wild-type flies ($n \geq 54$). Data are mean \pm SEM. Unpaired *t*-test; NS, not significant ($P > 0.05$).

3. Conclusions

Nos résultats montrent que la MRA et la MLT sont toutes deux sensibles à de courtes privations de sommeil réalisées entre 4 et 16 h après la fin du conditionnement, pendant l'étape de consolidation. De manière spectaculaire, la mémoire n'est pas affectée si le rappel mnésique a lieu pendant le pic d'activité du soir. Ainsi, nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre les étapes de consolidation et de rappel, c'est à dire qu'une fragilisation de l'étape de consolidation par une privation de sommeil, peut être compensée au niveau de l'étape du rappel par le rythme circadien. Nous ne savons pas si l'effet observé est directement lié aux mécanismes moléculaires régissant l'horloge circadienne, ou si, plus vraisemblablement, cet effet est dû à un état général du cerveau, état "plus performant" présent chez des mouches particulièrement actives. Enfin, les résultats sont similaires en ce qui concerne les deux types de mémoire consolidée. Si la MRA semble être une mémoire moins exigeante au niveau énergétique que la MLT, elle n'en n'est pas moins strictement dépendante du sommeil. Des mécanismes similaires lient donc le sommeil à la consolidation d'une part, et le rythme circadien au rappel mnésique d'autre part, pour la consolidation de la MRA et de la MLT.

Nous avons montré que les facteurs circadiens peuvent influencer la sensibilité de la mémoire aux privations de sommeil. En effet, la MRA des drosophiles dépourvues de rythme circadien est insensible à une privation de sommeil. Il semble donc que la consolidation de la MRA soit moins dépendante du sommeil si le rythme circadien est perturbé.

Cette étude met donc en évidence la corrélation complexe qui existe entre le rythme circadien, le sommeil, et les étapes de consolidation et de rappel de la mémoire.

4. Résultats additifs à l'article

Deux expériences complémentaires portant sur l'étude de la MLT sont en lien direct avec les résultats présentés dans cet article. Ces expériences supplémentaires ont pour but de confirmer que la MLT présente la même sensibilité que la MRA à une privation de sommeil.

Ainsi, nous avons réalisé l'expérience présentée dans figure 2C de l'article (page 95) mais avec un conditionnement espacé. C'est à dire un conditionnement à ZT6, une privation de sommeil à ZT12-16 et un test 24 h après le conditionnement à ZT6. Comme pour la MRA, nous observons une chute du score chez les drosophiles privées de sommeil (Figure 17). Ce

résultat renforce nos conclusions sur le fait que les deux mémoires consolidées sont sensibles à une privation de sommeil sauf si le test de mémoire est réalisé à ZT10 (à comparer avec la figure 2G de l'article).

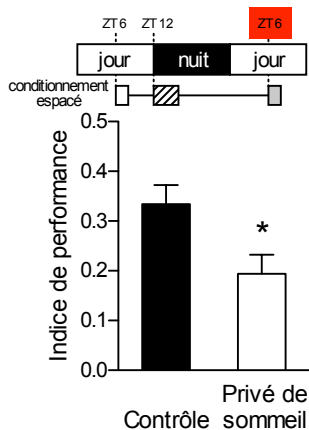


Figure 17 : Une privation de sommeil de 4 h affecte la MLT lorsque le test a lieu à ZT6.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles espacés puis privées de sommeil pendant 4 h et testées au temps indiqué au dessus du graphique. La privation de sommeil provoque un défaut de mémoire ($n = 12$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; * ($P < 0.05$).

Afin d'analyser l'importance du sommeil dans la consolidation de la MLT chez des drosophiles arythmiques, nous avons réalisé la même expérience que celle présentée dans la figure 3C de l'article (page 97), mais avec un conditionnement espacé. Les drosophiles ont donc été placées en jour constant, afin qu'elles deviennent arythmiques. Elles ont ensuite été conditionnées à LL2, privées de sommeil à LL8-12 et testées à LL4. Comme nous pouvons le constater sur la Figure 18, les drosophiles ne sont pas sensibles à une privation de 4 h de sommeil. Tout comme la MRA (Figure 3C de l'article, page 97), la MLT semble donc être insensible à une privation de sommeil de 4 h si les drosophiles sont arythmiques.

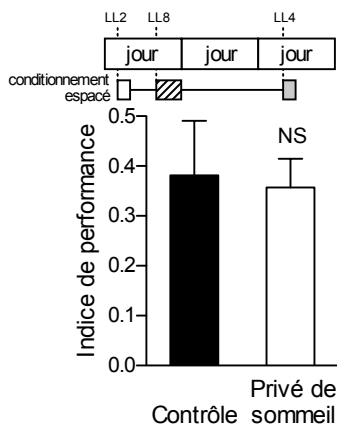


Figure 18 : La privation de sommeil n'affecte pas la MLT chez des drosophiles arythmiques.

Des drosophiles sauvages placées en condition constante de jour ont été conditionnées avec 5 cycles espacés puis privées de sommeil et testées aux temps indiqués au dessus du graphique. La privation de sommeil ne provoque pas de défaut de mémoire ($n = 12$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

Ces résultats confirment donc notre hypothèse: les deux types de mémoire consolidée qui existent chez la drosophile semblent présenter les mêmes caractéristiques en ce qui concerne leur sensibilité à une privation de sommeil.

Un test le soir permet de compenser l'effet délétère d'une privation de sommeil sur la consolidation de la MRA et de la MLT. L'influence du rythme circadien se fait donc lors du rappel mnésique, à un niveau vraisemblablement commun entre les deux mémoires. Très récemment, notre équipe a identifié les neurones de sorties des mémoires consolidées, les MB-V2 (Séjourné *et al.*, 2011). Le blocage de ces neurones pendant le rappel provoque des défauts mnésiques spécifiques des mémoires consolidées. Les dendrites de ces neurones projettent au niveau des lobes verticaux des CPs et les axones projettent au niveau de la corne latérale. Les expériences d'imagerie calcique (avec la sonde GCaMP3) ont démontré que ces neurones répondent aux odeurs et que de plus, 3 h après 1 cycle de conditionnement, ces neurones répondent plus fortement au CS- qu'au CS+. Cette différence de réponse entre les 2 odeurs du conditionnement reflète donc l'apprentissage (la sortie de la mémoire).

Nous avons émis l'hypothèse que l'influence du rythme circadien sur le rappel de la mémoire se fait au niveau de ces neurones. Afin d'analyser la réponse calcique des MB-V2, nous avons utilisé le pilote d'expression R71D08 qui est plus spécifique des MB-V2 que celui utilisé dans l'article (NP2492). Nous avons en préambule vérifié que l'expression de la sonde calcique à l'aide du pilote d'expression R71D08 ne provoque pas de défaut de mémoire à 24 h après 5 cycles massés. Comme on peut le constater dans la Figure 19, l'expression de la GCamp3 dans les MB-V2 ne provoque pas de défaut de MRA.

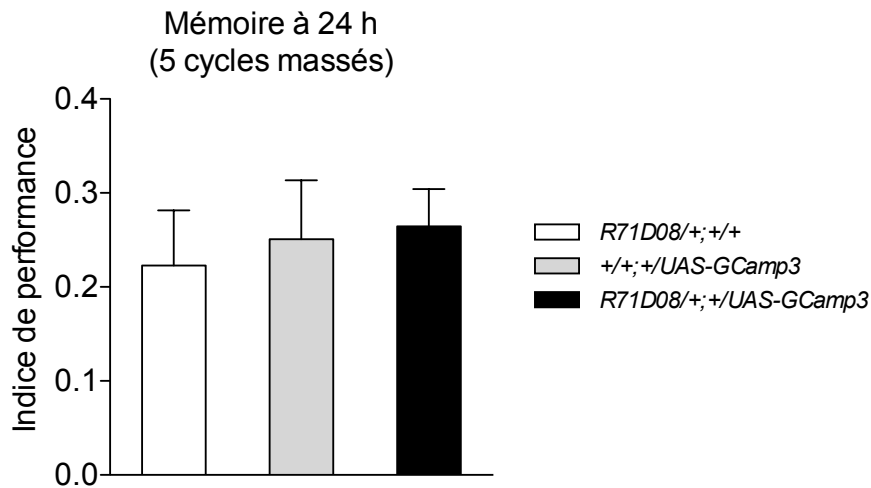


Figure 19 : La MRA n'est pas affectée par l'expression de la sonde GCaMP3 dans les MB-V2. L'expression de la sonde GCaMP3 à l'aide du pilote d'expression R71D08 ne provoque pas de défaut de MRA ($n \geq 11$, one-way ANOVA, $F_{2,34}=0,174$, $P = 0.84$). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Ensuite, nous avons analysé la différence de la réponse calcique au CS+ d'une part, et au CS- d'autre part, 24 h après un conditionnement massé. Les résultats indiquent que ces neurones répondent plus fortement au CS+ 24 h après un conditionnement massé lorsque le CS+ est l'octanol (Figure 20-A). Cependant, ce n'est pas le cas lorsque le CS+ est le methylcyclohexanol (Figure 20-B).

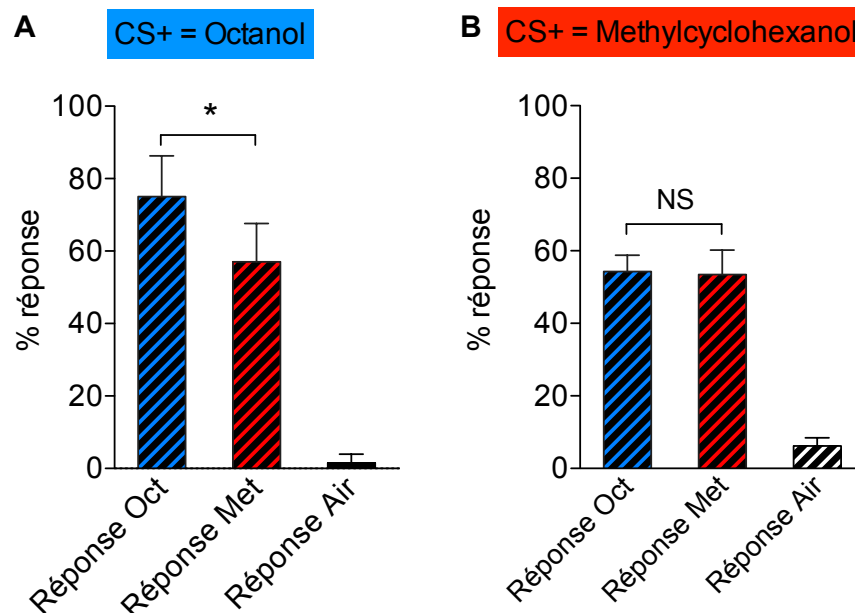


Figure 20 : Moyenne des réponses calciques 24 h après 5 cycles massés.

Les drosophiles (*R71D08/+;UAS-GCaMP3/+*) ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis leurs cerveaux ont été disséqués 24 h après pour analyser les réponses calciques au CS+ et au CS-. (Oct, Octanol; Met, Methylcyclohexanol). (A) La réponse calcique des MB-V2 est significativement plus forte pour l'octanol si le CS+ est l'octanol ($n = 6$). (B) La réponse calcique des MB-V2 n'est pas différente à l'octanol et au methylcyclohexanol lorsque le CS+ est le methylcyclohexanol ($n = 7$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student, paired t-test; NS, non significatif ($P > 0.05$).

Nous n'avons pas poursuivi ces expériences car **(i)** nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats pour les deux odeurs, et **(ii)** parce que la différence de réponse entre le CS+ et le CS- est inversée par rapport aux résultats publiés dans l'article de Séjourné *et al.*. Il est envisageable que cette différence soit due aux différences de protocoles de conditionnement. En effet, nous avons analysé la réponse calcique des MB-V2 24 h après un conditionnement massé alors que dans l'article publié, l'analyse est réalisée 3 h après 1 cycle de conditionnement.

PARTIE II: Effet d'une privation de sommeil juste apres le conditionnement

Dans cette troisième partie, je vais présenter les résultats d'expériences réalisées pour étudier les effets sur la consolidation de la mémoire d'une privation de sommeil ayant lieu juste après le conditionnement.

Pour ces expériences, il y a un court laps de temps (10 à 25 min) entre la fin du conditionnement et le début de la privation de sommeil dans le SNAP. Afin de s'assurer que les drosophiles ne dorment pas pendant cette période, des petits coups sont donnés manuellement et régulièrement sur les tubes. Les drosophiles ne peuvent donc pas dormir entre la fin du conditionnement et la fin de la privation de sommeil dans le SNAP.

1. La privation de sommeil juste après le conditionnement n'affecte pas la formation de la mémoire résistante à l'anesthésie

Nous avons tout d'abord étudié l'effet d'une privation de sommeil de 4 h qui a lieu à la suite (t_0) d'un conditionnement massé effectué le matin à ZT2. De façon très surprenante, les drosophiles testées à ZT4, donc pas pendant le pic d'activité, ne présentent pas de défaut de mémoire (Figure 21-A). La privation de sommeil à t_0 ne semble donc pas avoir d'effet sur la consolidation.

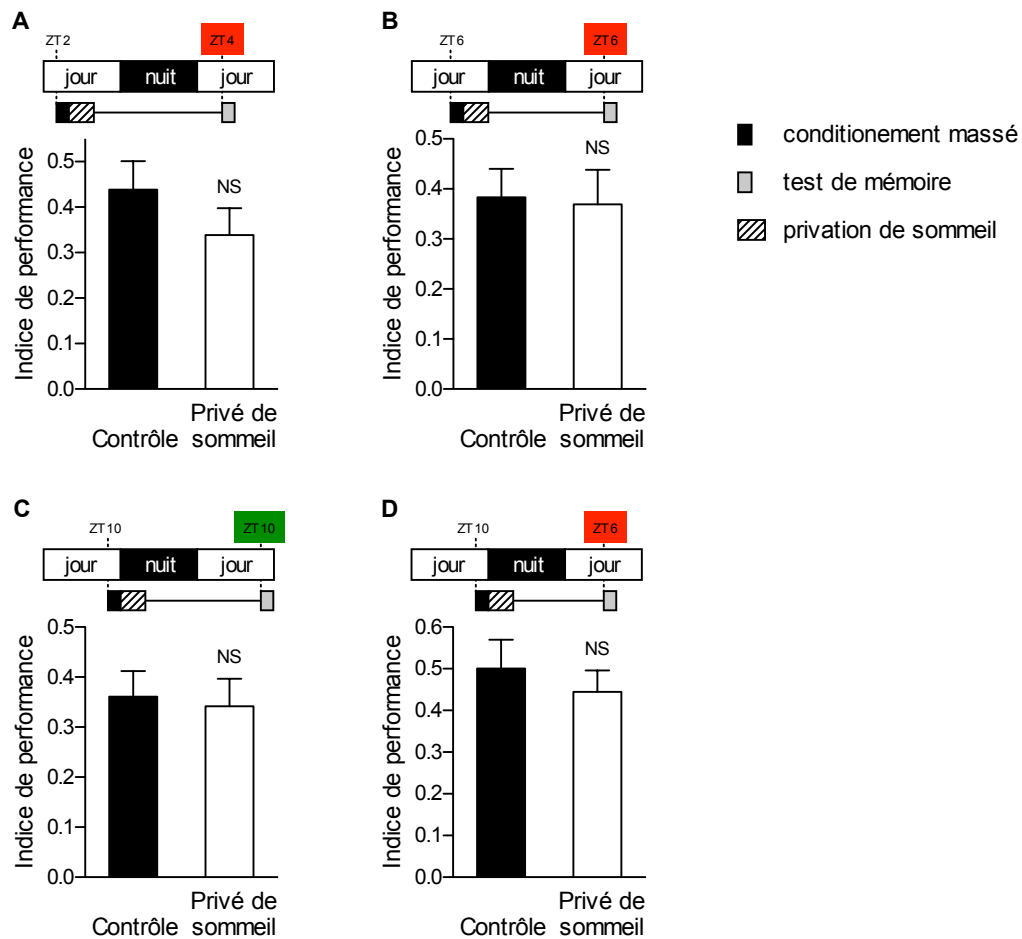


Figure 21 : Une privation de sommeil à t_0 n'a pas d'effet sur la consolidation de la MRA.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis privées de sommeil à t_0 et testées aux temps indiqués dans le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de mémoire ($n \geq 10$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

Pour étudier un effet possible du rythme circadien sur la mémoire consolidée observée après une privation à t_0 , nous avons décalé dans le temps le conditionnement et le test (ZT6 et ZT10). Dans le cas d'un conditionnement à ZT6, la privation de sommeil à t_0 n'a pas d'effet délétère sur la mémoire (Figure 21-B).

Pour ce qui est de l'expérience avec le conditionnement à ZT10, un test 24 h après reviendrait à tester les drosophiles durant le pic d'activité. Cela pourrait donc compenser un défaut de consolidation dû à la privation de sommeil (cf. article). Nous avons donc testé ces mouches à ZT10 et également à ZT6, soit 20 h après le conditionnement. Dans les 2 cas, une privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de MRA (Figure 21-C,D).

De façon étonnante, dans 3 de ces expériences, la privation de sommeil à t_0 n'affecte pas la mémoire des drosophiles bien qu'elles ne soient pas testées pendant le pic d'activité.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc d'émettre la conclusion suivante: une privation de sommeil juste après le conditionnement n'a pas d'effet négatif sur la consolidation de la MRA.

2. La privation à t_0 n'affecte pas la formation de la mémoire à long terme

Nous avons ensuite voulu savoir si l'autre type de mémoire consolidée, la MLT, est elle aussi insensible à une privation de sommeil à t_0 . Nous avons donc conditionné les drosophiles avec un protocole espacé à ZT6, puis elles ont été privées de sommeil pendant 4 h à t_0 . Le test de mémoire réalisé 24 h après nous montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les mouches privées de sommeil et les mouches contrôles (Figure 22). Ainsi, la MLT semble elle aussi insensible à une privation de sommeil réalisée juste après le conditionnement.

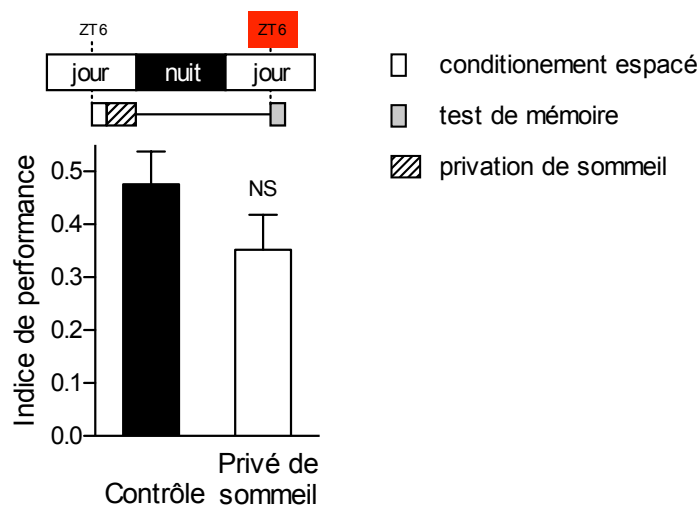


Figure 22 : Une privation de sommeil à t_0 n'a pas d'effet sur la consolidation de la MLT.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles espacés puis privées de sommeil à t_0 et testées aux temps indiqués sur le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de mémoire ($n = 12$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

3. Une privation de 8 h à t_0 n'affecte pas les mémoires consolidées

Pour expliquer les résultats précédents, nous pouvons imaginer que les processus de consolidation qui interviennent normalement juste après le conditionnement ont été mis en "attente" par la privation de sommeil à t_0 . Ainsi, la privation ne ferait que repousser de 4 h les

processus de consolidation. Pour étudier cette hypothèse, nous avons doublé le temps de privation. Tout d'abord avec un conditionnement massé ou espacé le soir à ZT10. Comme on peut le constater, les drosophiles privées de 8 h de sommeil présentent des scores similaires à ceux des contrôles (Figure 23-A,B). De façon étonnante, une privation de sommeil deux fois plus longue à t_0 ne semble pas avoir d'effet négatif sur la consolidation de la MRA et de la MLT. Ces résultats pourraient être attribués au moment du test qui a lieu pendant le pic d'activité ou bien au fait que les 8 h de privation n'affectent pas la consolidation.

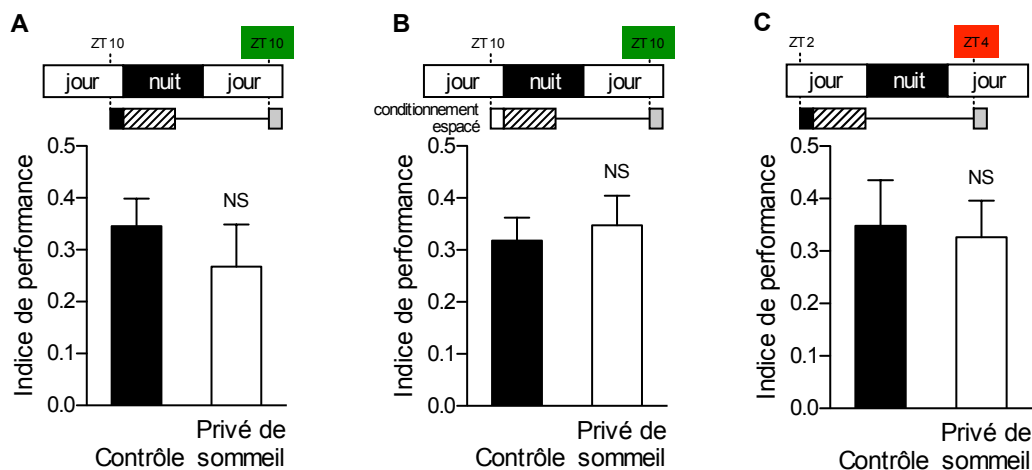


Figure 23 : Une privation de sommeil de 8 h à t_0 n'affecte pas la consolidation de la MRA et la MLT.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés ou espacés puis privées de sommeil pendant 8 h à t_0 et testées au temps indiqué sur le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de mémoire ($n \geq 10$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

Afin de distinguer ces deux hypothèses, nous avons réalisé une privation de sommeil de 8 h après un conditionnement massé qui a lieu le matin à ZT2. De façon très surprenante, les drosophiles privées de 8 h de sommeil et testées à ZT2 ont là encore une mémoire semblable à celle des contrôles (Figure 23-C).

Il est très peu probable que les processus de consolidation puissent être mis en "attente" pendant 8 h. Ces résultats suggèrent donc qu'une privation de sommeil à t_0 ne perturbe pas la consolidation de la mémoire.

4. La privation de sommeil à t_0 ne modifie pas la qualité de la mémoire formée

Sachant que le processus de consolidation se met en place juste après le conditionnement, il apparaît étonnant qu'une privation de sommeil à t_0 n'affecte pas cette étape. Nous avons voulu savoir si la qualité de la mémoire formée dans ces conditions était différente de celle attendue, c'est à dire différente de la MRA formée après un conditionnement massé et présente à 24 h. Nous avons ainsi analysé : 1) la quantité de mémoire labile présente à 24 h, 2) la stabilité de la mémoire dans le temps, 3) la formation de mémoire consolidée après seulement 1 cycle de conditionnement, et 4) la mémoire d'un mutant spécifique de MRA.

1- Pour analyser la mémoire labile, nous avons réalisé des anesthésies par le froid. En effet, une brève anesthésie d'une minute réalisée 1 h avant le test mnésique provoque l'effacement de la composante labile de la mémoire. Nous avons donc répété l'expérience de la Figure 21-A en réalisant une anesthésie des mouches par le froid. L'indice de performance mesuré après anesthésie correspond donc exclusivement à la MRA. Nous observons après traitement par le froid une baisse du score de mémoire d'environ 24% pour le groupe contrôle, et une baisse d'environ 46% pour les drosophiles privées de sommeil (Figure 24). Néanmoins, dans les deux cas, la baisse du score n'est pas statistiquement différente du score de mémoire obtenu pour les drosophiles qui n'ont pas subi d'anesthésie (Figure 24). Il est relativement classique d'observer une variabilité élevée pour ce type d'expérience, et ayant atteint un échantillon déjà assez élevé ($n = 21$, soit environ le double du nombre d'expériences habituelles), nous avons choisi d'arrêter ces expériences. Ces observations indiquent qu'il n'y a pas de mémoire labile à 24 h après un conditionnement massé et suggèrent que la privation de sommeil à t_0 ne modifierait pas la quantité de mémoire consolidée formée.

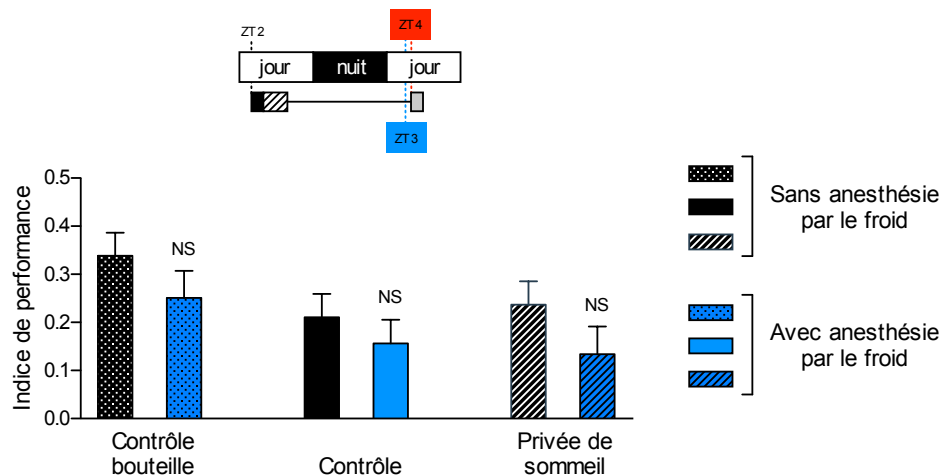


Figure 24 : Effet d'une privation de sommeil à t_0 sur la consolidation de la MRA.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis privées de sommeil à t_0 et anesthésiées par le froid pendant 1 min, 1 h avant le test (ligne bleue pointillée). La privation de sommeil à t_0 ne modifie pas la qualité de la mémoire qui est formée ($n \geq 17$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

2- Pour étudier la stabilité de la mémoire formée, nous avons réalisé les tests mnésiques 48 h après le conditionnement (au lieu de 24 h). Les scores de mémoire observés à 48 h sont similaires pour les drosophiles privées de sommeil à t_0 et les mouches contrôles (Figure 25). Nous concluons que la stabilité de la mémoire formée après un conditionnement massé n'est pas affectée par une privation de sommeil à t_0 .

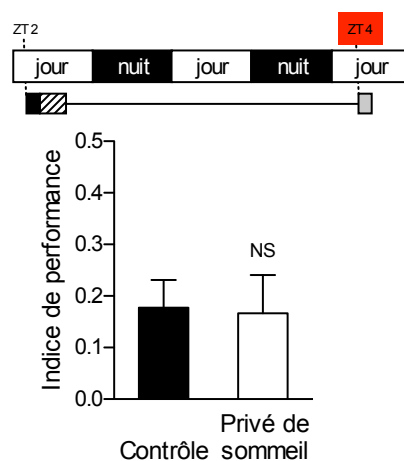


Figure 25 : La privation de sommeil à t_0 ne modifie pas la stabilité de la MRA formée.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis privées de sommeil à t_0 et testées au temps indiqué sur le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de mémoire ($n \geq 10$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

3- Afin d'évaluer la capacité des mouches à former de la mémoire consolidée, nous les avons soumises à un seul cycle de conditionnement. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, 1 cycle de conditionnement induit la formation de mémoire labile mais aussi de MRA. Ainsi, le score mesuré à 24 h après ce protocole correspond à de la MRA. Cependant, les indices de performances sont plus faible qu'à 24 h après 5 cycles massées. Comme on peut le constater sur la Figure 26, la mémoire mesurée à 24 h est similaire chez les mouches privées de sommeil à t_0 et les mouches contrôles.

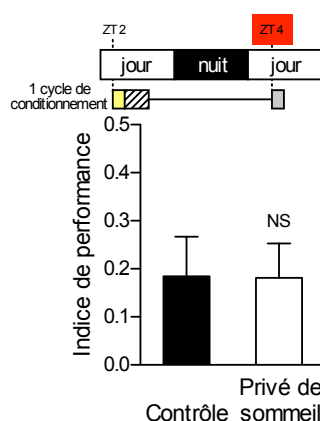


Figure 26 : Effet d'une privation de sommeil à t_0 sur la consolidation de la mémoire résistante à l'anesthésie.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 1 seul cycle puis privées de sommeil à t_0 et testées au temps indiqué sur le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne provoque pas de défaut de mémoire ($n = 11$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

4- Enfin, nous avons analysé l'effet d'une privation de sommeil à t_0 sur un mutant de mémoire spécifique de la MRA qui est en cours de caractérisation au laboratoire (Séjourné *et al.* en préparation + thèse de Julien Séjourné). Chez ce mutant, la privation de sommeil à t_0 n'a pas d'effet significatif sur le score de mémoire (Figure 27). Pour les groupes contrôles en bouteilles, la différence du score de mémoire n'est pas significative car il y a de la variabilité dans les expériences ($n = 8$). Cependant, le score de mémoire des drosophiles gal^{2805} est deux fois plus faible que celui des contrôles. Vu que la tendance est faible entre les groupes des drosophiles en tubes trikinetics, nous n'avons pas poursuivi cette expérience.

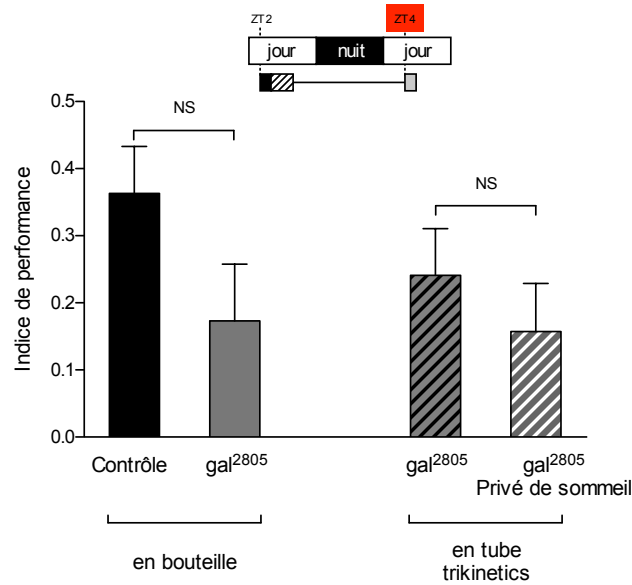


Figure 27 : Une privation de sommeil de 4 h à t_0 n'affecte pas la consolidation de la MRA chez le mutant gal^{2805} .

Des drosophiles sauvages ou mutantes (gal^{2805}) ont été conditionnées avec 5 cycles massés et privées de sommeil à t_0 au temps indiqué sur le schéma. La privation de sommeil à t_0 ne modifie pas la quantité de mémoire labile qui est formée ($n \geq 8$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

En conclusion, l'ensemble de ces expériences suggère que la qualité de la mémoire formée chez les drosophiles privées de sommeil à t_0 est identique à celle des contrôles. Ainsi, une privation à t_0 n'affecte pas le processus de consolidation de la MRA.

5. Une privation de sommeil à t_0 a un effet positif sur la consolidation

Selon les résultats obtenus jusqu'ici, une privation de sommeil à t_0 n'a pas d'effet sur la consolidation (Figure 28-A), elle ne modifie apparemment ni la quantité, ni la qualité de la mémoire formée. Dans l'article présenté dans la Partie I, nous avons démontré qu'une privation de sommeil de 4 h à ZT8-12 après un conditionnement massé réalisé à ZT2 provoque un défaut de mémoire (Figure 28-B). Une privation de 8 h à t_0 devrait donc provoquer un défaut de mémoire semblable à celui observé dans la Figure 28-B. Or, comme nous l'avons décrit dans la partie C, les drosophiles privées de 8 h de sommeil à t_0 ont des scores comparables aux contrôles (Figure 28-C). Elles sont donc devenues insensibles à la 2nd partie des 8 h de privation (ZT8-12).

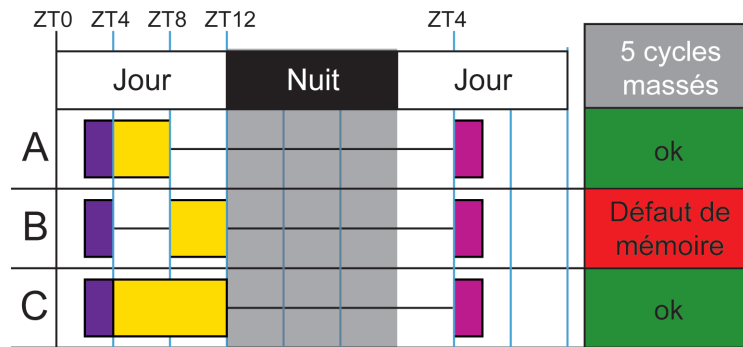


Figure 28 : Schéma récapitulatif n°1.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées à ZT2 avec 5 cycles massés puis privées de sommeil et testées à ZT4. La boîte violette indique le conditionnement, la boîte jaune indique celui de la privation de sommeil et la mauve celui du test de mémoire.

Cette observation suggère qu'une privation de sommeil pendant les 4 heures à t_0 pourrait exercer un effet positif sur la consolidation de la mémoire car les drosophiles deviennent insensibles à une privation (ZT8-12) qui normalement perturbe la consolidation de la MRA.

Afin de valider cette hypothèse nous avons réalisé une expérience avec 2 privations de 4 h. La 1^{ère} privation intervient à t_0 et la 2^{de} à ZT12-16 (Figure 29-C). Pour rappel, dans l'article, nous avons démontré qu'une privation de 4 h à ZT12-16 engendre un défaut de mémoire (Figure 29-B). Les résultats présentés dans la Figure 30-A indiquent que la mémoire mesurée à 24 h est similaire chez les mouches privées de sommeil et les mouches contrôles. Cette expérience démontre donc qu'une privation de sommeil juste après le conditionnement rend la consolidation de la mémoire insensible à une 2^{de} privation ultérieure.

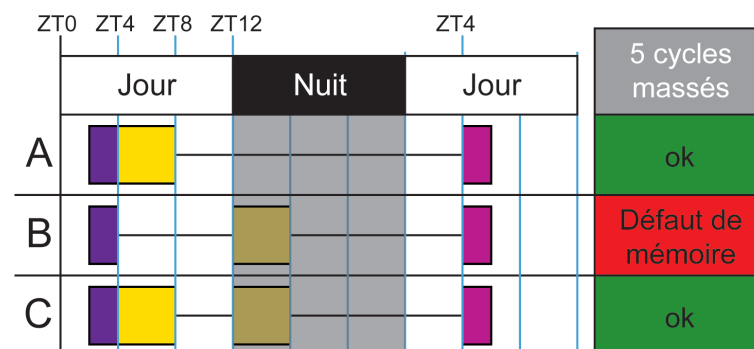


Figure 29 : Schéma récapitulatif n°2.

Des drosophiles sauvages ont été conditionnées à ZT2 avec 5 cycles massés puis privées de sommeil et testées à ZT4. La boîte violette indique le conditionnement, la boîte jaune indique celui de la privation de sommeil et la mauve celui du test de mémoire.

Pour valider ce résultat, nous avons remplacé la fenêtre de privation à t_0 par un contrôle mécanique. Pour rappel, nous avons utilisé ce protocole dans l'article pour démontrer que les défauts de mémoire observés après privation n'était pas du au stress potentiellement provoqué par les stimulation mécaniques. Durant ce contrôle mécanique, les drosophiles reçoivent le même nombre de stimulations que durant une privation de sommeil mais sur une période plus courte. Au lieu de recevoir une stimulation toute les 5 minutes, elles reçoivent une stimulation toutes les minutes. Elles peuvent ainsi dormir 48 min/h sur les 4 heures que dure ce traitement. Comme on peut le voir sur la Figure 30-B, le groupe soumis au contrôle mécanique à t_0 puis à une privation de sommeil à ZT12-16 présente un défaut de mémoire par rapport au groupe sans perturbations. Le traitement du contrôle mécanique n'a donc pas le même effet qu'une privation de sommeil puisque la consolidation reste sensible à une privation de sommeil à ZT12-16.

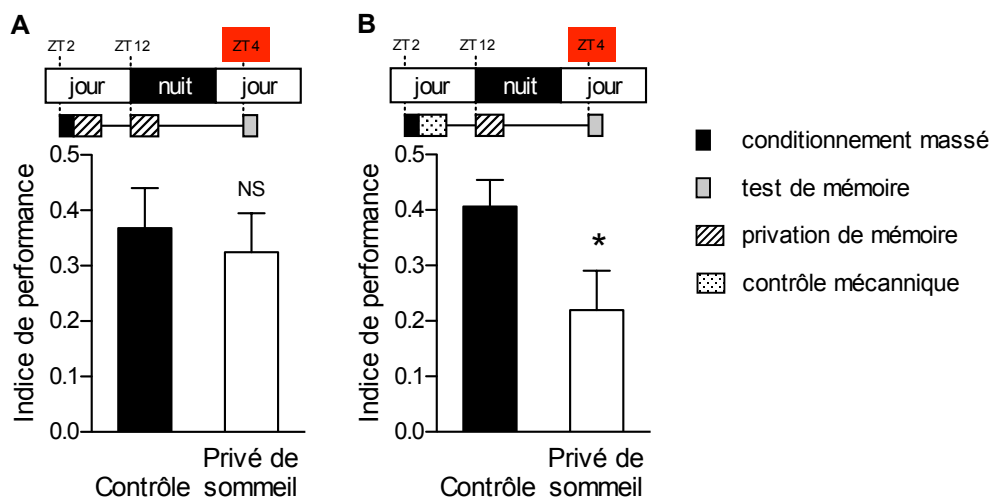


Figure 30 : La privation de sommeil à t_0 exerce un effet positif sur la consolidation de la MRA.

(A) Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis privées de sommeil pendant 4 h à t_0 et privées de sommeil à ZT12-16. La double privation de sommeil ne provoque pas de défaut de mémoire ($n = 9$). (B) Des drosophiles sauvages ont été conditionnées avec 5 cycles massés puis soumises à un contrôle mécanique à t_0 et privées de sommeil à ZT12-16. Le traitement du contrôle mécanique n'a pas d'effet positif sur la consolidation de la mémoire ($n = 17$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$), * ($P < 0.05$).

L'ensemble de ces résultats confirme que la privation de sommeil à t_0 exerce un effet positif sur la consolidation car elle rend la mémoire insensible à une privation ultérieure. On peut donc supposer que la consolidation de cette mémoire est renforcée et qu'il est ainsi plus difficile de la perturber par la suite.

6. La privation de sommeil à t_0 n'altère pas le "reversal learning"

L'une des conséquences d'une privation de sommeil est l'augmentation dans le cerveau (et donc dans les CPs) de marqueurs synaptiques, indiquant que les synapses sont actives (Gilestro *et al.*, 2009). On peut donc se demander si une privation de sommeil lors des premières étapes du processus de consolidation ne pourrait pas renforcer les synapses créées pendant l'apprentissage. Ainsi, la mémoire serait plus fortement consolidée et deviendrait alors insensible à une 2nde privation de sommeil. Les synapses correspondant à la mémoire formée seraient donc figées, rendant plus difficile le remodelage requis afin d'effacer cette mémoire.

Nous avons donc voulu savoir si les drosophiles soumises à une privation de sommeil à t_0 sont capables d'oublier l'information apprise durant le conditionnement. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un 2nd conditionnement avec 1 cycle d'apprentissage appliqué 3 h avant le test de mémoire. Lors de ce 2nd conditionnement, l'odeur qui est associée aux chocs (CS+) est inversée par rapport au 1^{er} conditionnement.

Les résultats sont présentés dans la Figure 31 l'indice de performance est calculé par rapport au 2nd conditionnement (ce qui explique le résultat négatif pour les "CS (5x)"). Les deux premières colonnes sont des contrôles pour s'assurer que les 2 conditionnements se sont bien déroulés. Les 3 dernières colonnes représentent les mouches en tubes trikinetics. Comme on peut le constater, même s'il y a une légère tendance à la baisse, les drosophiles privées de sommeil à t_0 présentent des scores similaires à ceux des contrôles. La privation de sommeil pourrait perturber le 2nd apprentissage indépendamment du 1^{er}. Pour cette raison, nous avons réalisé un contrôle pour lequel des drosophiles naïves ont été privées de sommeil puis conditionnées avec 1 cycle. Les résultats montrent qu'une privation de sommeil précédent de 15 h le conditionnement, ne semble pas perturber l'apprentissage.

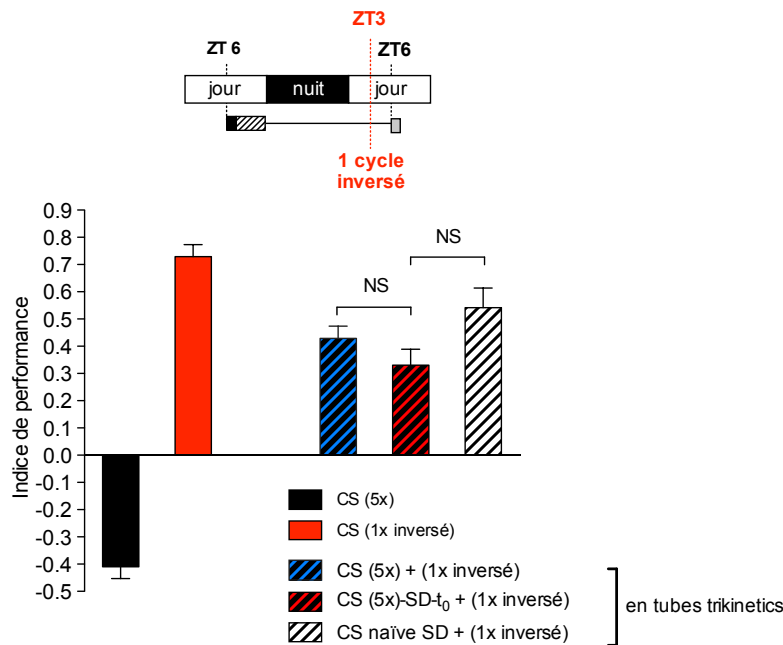


Figure 31 : La privation de sommeil à t_0 n'affecte pas le "reversal learning".

Des drosophiles sauvages (CS) ont été conditionnées avec 5 cycles massés (5x) puis privées de sommeil pendant 4 h à t_0 , et reconditionnées avec 1 cycle où les odeurs sont inversées (1x inversé) 3 h avant le test mnésique. La privation de sommeil à t_0 n'empêche pas les drosophiles d'oublier le 1^{er} conditionnement pour apprendre le 2nd ($n \geq 5$). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Test de student; NS, non significatif ($P > 0.05$).

La privation de sommeil à t_0 ne semble donc pas renforcer la consolidation de la mémoire au point d'empêcher la formation d'une nouvelle mémoire suite à un autre conditionnement. Cependant, on peut noter que dans cette expérience, le 2nd conditionnement intervient assez tardivement par rapport à la privation de sommeil (15 h après). Il est donc envisageable que le cerveau retrouve un état de fonctionnement "normal" pendant la nuit. Dans ce cas, l'effet bénéfique d'une privation de sommeil à t_0 serait temporaire. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser le second conditionnement plus rapidement après la fin de la privation de sommeil à t_0 .

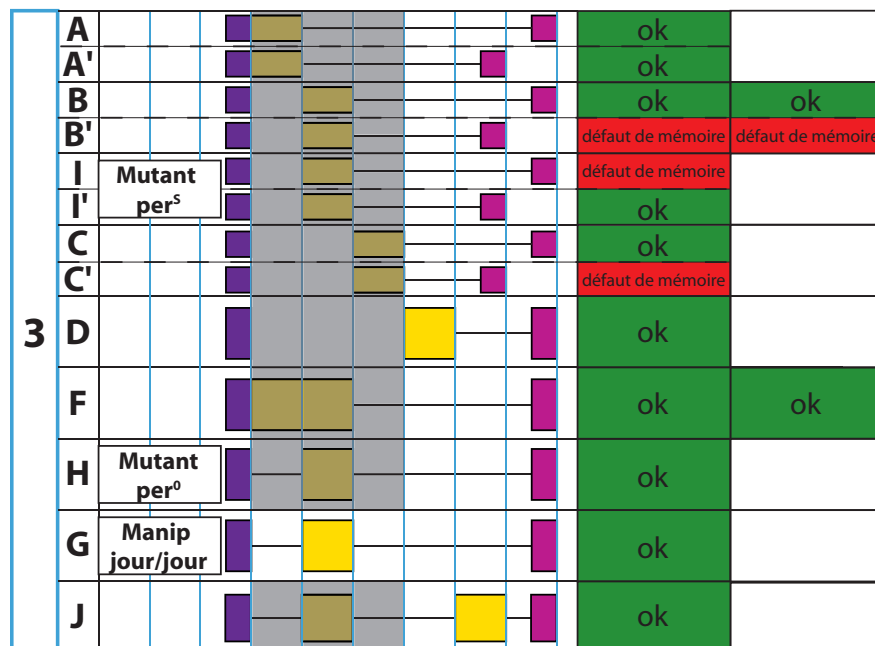
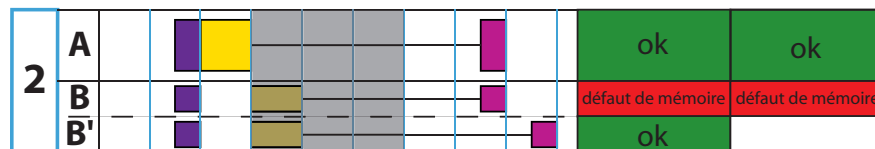
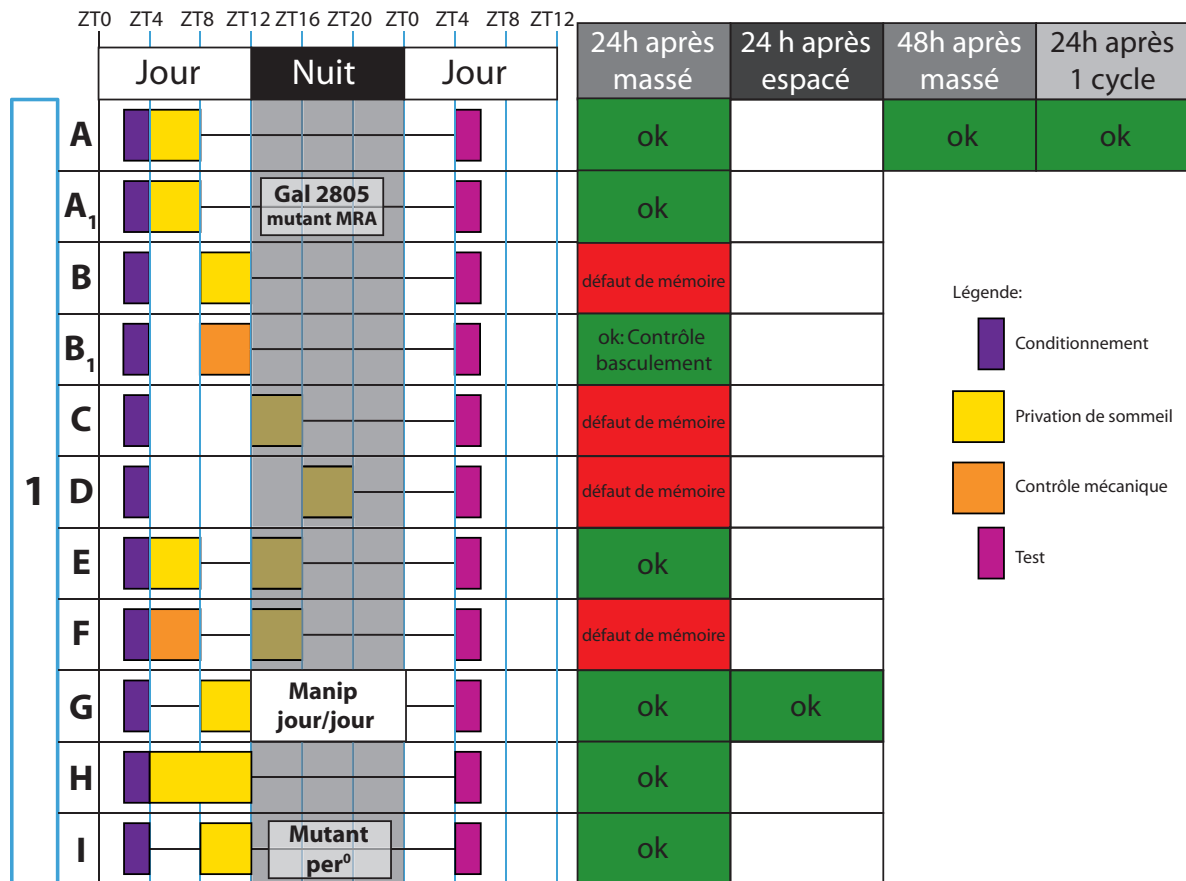


Figure 32 : Résumé des résultats de la partie I et II.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Que l'on s'intéresse aux drosophiles ou aux mammifères, il semble communément admis qu'il existe un lien entre le sommeil et la plasticité synaptique. Néanmoins, la façon dont ces modifications s'opèrent pendant le sommeil demeure incertaine. Il existe actuellement 2 principales hypothèses non-exclusives pour décrire les mécanismes qui agissent pendant le sommeil pour réguler la plasticité synaptique nécessaire aux processus mnésiques. (1) Selon la théorie de l'homéostasie synaptique (Tononi & Cirelli, 2006), la plasticité synaptique qui se produit pendant l'éveil est consommatrice d'énergie, d'espace, et limite les capacités d'apprentissage. Le sommeil serait donc nécessaire pour un retour au niveau basal de la force synaptique, ce qui permettrait d'économiser de l'espace en supprimant les synapses "inutiles" et en restaurant ainsi les capacités d'apprentissage. (2) D'après l'hypothèse de la consolidation active de la mémoire (Diekelmann & Born, 2010), les traces mnésiques sont réactivées pendant le sommeil ce qui permet de renforcer les réseaux neuronaux qui sous-tendent la mémoire. Ainsi, le rôle positif joué par le sommeil pendant la consolidation de certains types de mémoire pourrait se réaliser *via* d'une part, une régulation négative généralisée des synapses non pertinentes, et d'autre part, *via* le renforcement spécifique de synapses potentialisées (ou "marquées"). En effet, dans toutes les espèces étudiées à ce jour (drosophiles, moineaux, hamster, souris, rats), l'éveil s'accompagne d'une régulation positive de la transcription des gènes impliqués dans la réponse au stress cellulaire et dans certains processus nécessaires à l'activité synaptique. A l'inverse, le sommeil s'accompagne d'une augmentation des transcrits jouant un rôle dans la dépression synaptique, l'entretien des membranes et le métabolisme lipidique (Cirelli *et al.*, 2004; Mackiewicz *et al.*, 2007).

Nos données démontrent que le sommeil joue un rôle important dans les processus de consolidation de la mémoire chez la drosophile. Nous discuterons dans un premier temps de l'implication du rythme circadien dans l'étape de rappel d'une mémoire fragilisée.

1. Effet du rythme circadien sur le rappel de la mémoire après une privation de sommeil

Effet négatif sur la MLT

En 2006, Ganguly-Fitzgerald *et al.* ont démontré chez la drosophile que 4 h de privation de sommeil, 4 h après la fin d'un conditionnement de comportement de cour, provoque un défaut de MLT (Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006). Ce résultat vient confirmer les nombreuses études qui ont déjà démontré l'importance du sommeil pour les processus de consolidation de la mémoire chez diverses espèces (Graves *et al.*, 2003; Hairston *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009b; Palchykova *et al.*, 2006a; Smith & Rose, 1996; Vecsey *et al.*, 2009). Dans notre étude, avec un paradigme de mémoire olfactive aversive, nous avons confirmé l'effet négatif d'une privation de sommeil 4 h après le conditionnement sur la MLT.

Effet négatif sur la MRA

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la MRA et la MLT sont deux mémoires consolidées mais qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Tout d'abord, ces deux mémoires n'ont pas la même perdurance, la MRA décline plus rapidement que la MLT dans les jours qui suivent le conditionnement (Tully *et al.*, 1994). Ces deux mémoires sont antagonistes, la formation de la MLT inhibe la formation de la MRA (Isabel *et al.*, 2004). De plus, contrairement à la MRA, la MLT dépend de la synthèse protéique *de novo* pour se mettre en place (Tully *et al.*, 1994). Enfin, d'un point de vue énergétique, la formation de la MRA est moins coûteuse que celle de la MTL car les drosophiles à jeun meurent plus rapidement après un conditionnement espacé qu'après un conditionnement massé (Mery & Kawecki, 2005). Aux vues de ces différences, on peut se demander si une privation de sommeil affecterait la consolidation de la MRA de la même manière que celle de la MLT. De façon surprenante, nos résultats démontrent que la MRA est elle aussi sensible à une privation de sommeil qui a lieu pendant la consolidation. Ces résultats suggèrent que la consolidation de la MRA est, tout comme celle de la MLT, dépendante de la plasticité synaptique qui se produit pendant le sommeil.

Lorsque la privation de sommeil intervient la nuit (ZT12-16 ou ZT16-20), les drosophiles conditionnées perdent environ 220 min de sommeil, soit $\approx 19\%$ du sommeil total sur 24 h. Il est intéressant de noter qu'une privation de sommeil qui intervient à ZT8-12, *i.e.* pendant la période où les drosophiles dorment le moins, provoque un défaut de MRA, bien que les drosophiles conditionnées ne dorment que 148 min pendant cette période, soit $\approx 12\%$ du sommeil total sur 24 h. Ainsi, une privation de seulement 12% du sommeil total sur 24 h affecte la consolidation de la MRA. Si la quantité de sommeil retirée peut paraître faible, la privation intervient sur une période de 4 h, ce qui correspond à une longue période en ce qui concerne les processus de consolidation mnésique.

De plus, la consolidation de la MRA après 5 cycles massés semble être un processus long puisqu'une privation qui a lieu 12 h après le conditionnement provoque un défaut de mémoire. Ce défaut n'est pas dû à un effet de la privation sur le rappel mnésique qui a lieu seulement 8 h après car nous avons aussi réalisé une expérience où la privation se termine 6 h avant le test, et dans ce cas, il n'y a pas de défaut de mémoire. La privation de sommeil 12 h après le conditionnement affecte donc bien l'étape de consolidation. Il reste encore à déterminer si l'effet du sommeil sur la consolidation de ces deux mémoires MRA et MLT, dépend ou non des mêmes mécanismes.

Voies moléculaires impliquées pendant le sommeil pour la consolidation de la mémoire

Chez la souris, il a été démontré qu'une courte privation de sommeil suffit à perturber la plasticité synaptique dépendante de la voie AMPc/PKA au niveau de l'hippocampe (Vecsey *et al.*, 2009). D'autre part, chez la drosophile, l'équipe de Guo a suggéré que l'effet délétère d'une privation de sommeil sur l'apprentissage de la MCT serait dû à une augmentation de la quantité d'AMPc dans les CPs (Li *et al.*, 2009b). Ainsi, il serait intéressant d'étudier les modifications d'activité de la PKA, au niveau des CPs, après une privation de sommeil. En effet, la PKA joue chez la drosophile un rôle important dans la régulation du sommeil ainsi que dans les processus de consolidation de la MRA et de la MLT.

Une autre voie moléculaire qui pourrait-être perturbée par la privation de sommeil et qui ainsi provoquerait des défauts de mémoire est celle de l'ecdysone. En effet, il a été démontré qu'une privation de sommeil provoque une augmentation du taux d'ecdysone dans le cerveau (Ishimoto & Kitamoto, 2010). Or, l'administration d'ecdysone entre le conditionnement et le test perturbe la consolidation de la MLT (Ishimoto *et al.*, 2009). Il est donc possible que son administration (ou sa libération) affecte aussi la MRA. Ainsi, afin

d'étudier l'implication de la voie de l'ecdysone pendant la privation de sommeil, il serait intéressant de bloquer cette voie pendant la privation de sommeil, par exemple, en inhibant les récepteurs à l'ecdysone en utilisant un allèle thermosensible (Bender *et al.*, 1997; Ishimoto *et al.*, 2009).

a) *La régulation circadienne*

Interaction entre l'étape de consolidation et celle du rappel

Nous avons démontré que les effets délétères de 4 h de privation de sommeil sur la mémoire peuvent être compensés si les tests de mémoire sont réalisés pendant une période naturelle où les drosophiles sont particulièrement actives (*i.e.* ZT10-12). Dans notre étude, des limitations techniques liées au traitement individuel des drosophiles ne nous ont pas permis de tester l'influence du pic d'activité du matin sur le rappel de la mémoire.

Nos données ainsi que celles de la littérature nous permettent d'exclure que cette compensation est due à: **(i)** une amélioration des perceptions sensorielles des drosophiles car il a été démontré que l'olfaction était meilleure pendant le milieu de la nuit, et non avant l'extinction des lumières (Krishnan *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005). Il n'y a donc pas de corrélation entre le pic d'olfaction et le pic d'activité de fin de journée. **(ii)** Une période plus longue entre la fin de la privation de sommeil et le test mnésique, ce qui permettrait de permettre une période de récupération aboutissant à une consolidation efficace de la mémoire. En effet, l'expérience de double privation et les expériences avec le mutant *per^S* vont à l'encontre de cette hypothèse.

Afin de confirmer l'influence du rythme circadien sur le rappel mnésique, nous avons déplacé le pic d'activité locomotrice des drosophiles en utilisant le mutant de rythme circadien *per^S*. En effet, chez ce mutant, le pic d'activité est avancé de 4 h. Ces expériences confirment que c'est l'influence du rythme circadien sur l'étape de rappel qui permet aux drosophiles de compenser le défaut de consolidation de la mémoire. L'ensemble de nos données ne nous permettent pas de déterminer clairement si cet effet est dû aux mécanismes de l'horloge circadienne ou, plus vraisemblablement, à un état général du cerveau qui serait en alerte et plus performant, ce qui faciliterait le rappel de la mémoire. Afin de discriminer ces deux hypothèses, nous pourrions modifier de façon artificielle l'activité des drosophiles pendant le test mnésique. Nous pourrions pour cela utiliser des molécules stimulantes comme la caféine ou bien utiliser le jeûne qui provoque une augmentation de l'activité des drosophiles.

En 2009, Lyons & Roman ont pu mettre en évidence une modulation circadienne de la MCT chez la drosophile (Lyons & Roman, 2009). Le pic de performance de la MCT se situe en début de nuit (ZT13-17) après l'association entre une odeur et un pulse de choc électrique. Nous pouvons noter que ce pic de performance ne coïncide pas avec la période de compensation du défaut mnésique (ZT10-12). De plus, les auteurs n'utilisent pas le même protocole de conditionnement que celui de notre étude. En effet, le pic de performance de MCT est beaucoup moins prononcé lorsque les drosophiles sont conditionnées avec un protocole classique (12 chocs électriques de 90 V - protocole utilisé dans notre laboratoire). Il a été démontré que l'indice de performance de l'apprentissage est positivement corrélé aux nombres de chocs électriques délivrés pendant le conditionnement (Beck *et al.*, 2000; Tully & Quinn, 1985). Ainsi, le protocole classique de conditionnement permet aux drosophiles d'atteindre des performances maximales ce qui masque en grande partie l'influence du rythme circadien dans l'étude de la MCT menée par Lyons & Roman. Enfin, dans cette étude, comme le test de mémoire a lieu 3 minutes après le conditionnement, les auteurs n'ont pas pu exclure que l'effet observé était dû à une modulation du rappel mnésique.

Plusieurs études réalisées chez différentes espèces ont déjà démontré l'existence d'une régulation circadienne de la formation de la mémoire. En effet, la comparaison des performances mnésiques diurnes et nocturnes a permis de corrélér positivement la phase d'activité circadienne à une meilleure formation de la MLT (chez le zebrafish (Rawashdeh *et al.*, 2007), l'Aplysie diurne (Fernandez *et al.*, 2003; Lyons *et al.*, 2005), l'Aplysie nocturne (Lyons *et al.*, 2005), la souris (Chaudhury & Colwell, 2002) et le rat (Valentinuzzi *et al.*, 2000; Valentinuzzi *et al.*, 2004)). Pour ce qui est des drosophiles qui sont des insectes crépusculaires (actifs le matin et le soir), la formation de la MLT n'est pas meilleure le jour que la nuit (Sakai *et al.*, 2004) (protocole comportement de cour). Il serait plus judicieux de comparer les indices de performance, sans privation de sommeil, entre un conditionnement à ZT6 et un à ZT10. Or, nous avons réalisé ces expériences et les indices de performance ne sont pas différents ($IP_{(ZT6)} = 0,33 \pm 0,04$ et $IP_{(ZT10)} = 0,35 \pm 0,06$). Ces observations suggèrent qu'il n'y a pas de modulation circadienne de l'apprentissage de la MLT. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'influence du rythme circadien soit masquée par le conditionnement utilisé qui génère un apprentissage élevé. Il serait peut-être nécessaire de se placer dans des conditions plus limitantes lors de l'apprentissage, comme celles utilisées lors de l'étude de Lyons & Roman, pour observer une modulation de la MLT par le rythme circadien.

Il est important de noter que dans notre étude, le rythme circadien n'influence pas les performances de la MRA des drosophiles non privées de sommeil. En effet, les drosophiles testées le soir n'ont pas un meilleur indice de performance que celles testées en milieu de journée. L'implication du rythme circadien dans le rappel de la mémoire semble donc être spécifique d'une mémoire fragilisée. Pour observer une modulation du rappel mnésique par le rythme circadien chez des drosophiles non privées de sommeil, il faudrait peut-être se placer dans des conditions plus limitantes (par exemple avec moins de chocs électriques).

Et si l'horloge influençait directement l'étape de rappel?

S'il s'agit d'un effet direct de l'horloge, on peut se demander quels sont les réseaux neuronaux qui permettent de moduler le rappel mnésique. **(i)** Cette modulation pourrait se produire au niveau des CPs car le rappel des mémoires consolidées nécessite l'activité des neurones α/β des CPs (Isabel *et al.*, 2004). Cependant, ces neurones n'expriment pas *Period* qui est l'une des protéines clef de contrôle du rythme circadien (Houl *et al.*, 2006; Kaneko & Hall, 2000), il semble donc peu probable que la régulation du rappel soit due à l'activité rythmique des CPs. **(ii)** Le rappel des mémoires consolidées est aussi dépendant de l'activité de neurones extrinsèques au CPs, les MB-V2 (Séjourné *et al.*, 2011). Cependant, nous ne savons pas si ces neurones expriment *Period*. **(iii)** Enfin, il est possible que des neurones impliqués dans le contrôle de la régulation circadienne modulent l'activité des CPs et/ou des MB-V2. Ces neurones pourraient être les "*small ventral lateral neurons*" dont les projections axonales se situent dans la zones des CPs (Helfrich-Forster, 1995). Bien que l'activité rythmique de ces neurones soit nécessaire pour la mise en place du pic locomoteur du matin (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004), il serait intéressant de bloquer leur activité pendant un test de mémoire réalisé à ZT10 pour voir si l'influence du rythme circadien sur le rappel mnésique est liée à ces neurones. Pour ce qui est des neurones qui régulent le pic d'activité du soir, les "*small dorsal lateral neurons*", il serait nécessaire de déterminer s'ils sont connectés directement avec les CPs, ou bien avec les MB-V2, et tenter de bloquer la communication synaptique entre ces neurones pendant un test à ZT10.

2. La consolidation de la mémoire des mutants de rythme circadien est insensible à une privation de sommeil.

Plusieurs études de mémoire ont déjà été réalisées chez différents mutants de rythme circadien. Ainsi, après un conditionnement de comportement de cour, les mutants *tim*⁰¹,

dClk^{Jrk}, cyc⁰ sont capables de former de la MLT (Sakai *et al.*, 2004). A l'inverse, avec le même paradigme, les mutants per⁰ et per^S présentent un défaut de MLT. Dans le cas du mutant per⁰, il est cependant possible de former de la MLT en augmentant la durée du conditionnement (11 h au lieu de 7 h, période pendant laquelle le mâle est en présence d'une femelle fécondée). Il semble donc qu'augmenter la durée du stimulus pendant le conditionnement permette de forcer la formation de MLT. Une étude d'un autre groupe a aussi décrit le mutant per⁰ comme étant mutant de MLT en utilisant un paradigme de mémoire olfactive aversive (Chen *et al.*, 2012). Dans ces études, l'analyse de la MRA de ces mutants n'a pas été réalisée. Dans nos expériences, avec un protocole olfactif aversif, les mutants per^S_(cs) et per⁰_(cs) sont capables de former de la MRA. Il est donc possible que ces mutations n'affectent que la MLT. Enfin, il est aussi possible que des différences de fond génétique expliquent la discordance de nos résultats. En effet, de nombreux exemples au laboratoire ont démontré le rôle crucial que peut jouer le fond génétique sur la mémoire.

L'effet de la privation de sommeil sur la mémoire est dépendant de l'horloge.

Nous avons aussi mis en évidence l'importance d'une horloge circadienne fonctionnelle pour la sensibilité de la mémoire à la privation de sommeil. En effet, contrairement à celle de drosophiles rythmées, la mémoire consolidée de drosophiles placées en conditions de lumière constante, ou bien celle de mutants per⁰ qui ne possèdent pas d'horloge fonctionnelle, n'est pas sensible à une privation de 4 h de sommeil. Dans ces deux cas, comme l'horloge n'est pas fonctionnelle, il n'y a pas de régulation circadienne du sommeil. Le profil du sommeil est donc différent de celui des drosophiles sauvages en conditions jour/nuit. Nous avons donc vérifié si l'absence de sensibilité de la mémoire à une privation de sommeil pouvait être due au fait que ces drosophiles perdent une plus faible quantité de sommeil. Les analyses suggèrent que l'absence de sensibilité ne serait pas due à une différence de la quantité/qualité de sommeil perdue pendant la privation. Ces résultats indiquent donc que la consolidation de la MRA et de la MLT est moins dépendante du sommeil lorsque l'horloge des drosophiles est perturbée.

L'absence d'effet néfaste de la privation de sommeil sur la consolidation de la mémoire peut aussi être due au fait que les processus de consolidation se déroulent plus rapidement en absence de rythme circadien. Ainsi, 4 h après la fin du conditionnement, la mémoire serait totalement consolidée, et la privation de sommeil ne pourrait plus affecter la mémoire. Afin d'analyser la "cinétique" de consolidation de la MRA chez ces mutants, nous pourrions réaliser des anesthésies par le froid à différents temps après un conditionnement massé. Il

serait peut être nécessaire de priver ces mutants de sommeil plus rapidement après la fin du conditionnement.

3. Effet sur la mémoire d'une privation de sommeil juste après le conditionnement.

La privation à t_0 n'affecte pas les mémoires consolidées

Pourquoi une privation de 4 h de sommeil à t_0 n'a-t-elle pas d'effet négatif sur la consolidation de la MRA et de la MLT? Une explication possible serait que la privation de sommeil immédiatement après le conditionnement repousse de 4 h les processus de consolidation qui seraient donc mis en attente. Or, les résultats de l'expérience de privation de 8 h à t_0 démontrent que cette hypothèse est peu probable. En effet, il faudrait alors que les processus de consolidation puissent être mis en attente pendant 8 h sans aucun effet négatif sur la mémoire. Il est important de noter ici que lorsque la privation intervient pendant les 8 premières heures de la nuit, les drosophiles perdent environ 440 min de sommeil sans que cela affecte les processus de consolidation.

Comment expliquer la différence de résultats entre l'étude publiée par Ganguly-Fitzgerald *et al.* et la notre.

Nos résultats sur l'absence d'effet néfaste d'une privation à t_0 sur la mémoire semblent être en contradiction avec l'étude de Ganguly-Fitzgerald *et al.*. En effet, ils ont démontré qu'une privation de sommeil à t_0 après un conditionnement de cour provoque un défaut de MLT (Ganguly-Fitzgerald *et al.*, 2006). Cependant, certains des paramètres expérimentaux utilisés pour ces deux études pourraient expliquer cette contradiction:

- L'analyse du comportement de cour ne peut-être réalisée, par définition, que sur des mâles alors que dans notre étude, nous avons utilisé des femelles. Même si cela semble peu probable, la discordance des résultats pourrait être dépendante du genre sexuel. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions tout simplement analyser l'effet d'une privation de sommeil à t_0 sur des mâles.

- La contradiction pourrait être due au fait que nous n'utilisons pas le même paradigme de comportement. Les processus mnésiques ne reposent donc pas sur les mêmes réseaux de neurones. En effet, le comportement de cour est dépendant des neurones qui expriment *fruitless* (Manoli *et al.*, 2005; Stockinger *et al.*, 2005). La privation de sommeil à t_0 pourrait donc perturber différenciellement les neurones qui expriment *fruitless* et qui sont nécessaires

pour le comportement de cour de ceux qui n'expriment pas *fruitless* et qui sont nécessaires pour la mémoire olfactive aversive.

- Enfin, pour générer de la MLT, les auteurs ont utilisé un protocole de conditionnement de cour qui dure 6 h alors que nous avons utilisé un protocole olfactif aversif qui dure 1 h 45. Il est donc envisageable que les processus de consolidation débutent avant la fin du conditionnement de cour. Ainsi, les différences observées pourraient être dues au fait qu'une privation de sommeil appliquée après le conditionnement de cour n'intervienne pas assez tôt, c'est à dire lors des premières étapes de consolidation. Afin d'être plus proche de leurs conditions expérimentales, nous pourrions donc réaliser une privation de sommeil qui débiterait 6 h après le début de notre conditionnement olfactif aversif. Or cette expérience correspond, à 15 min près, à une expérience que nous avons réalisée (donnée supplémentaire à l'article) pour laquelle les drosophiles privées de sommeil présentent un défaut de MLT. Même si la privation n'intervient pas sur la même période, il semble que cette hypothèse puisse expliquer la contradiction entre les deux études.

Comment la privation à t_0 peut-elle avoir un effet positif sur la MRA?

Les expériences nous ont permis de démontrer qu'une privation de sommeil à t_0 n'affecte pas les mémoires consolidées. De plus, lorsque les drosophiles sont soumises à une double privation, leur indice de performance n'est pas différent de celui du groupe contrôle. La privation de sommeil à t_0 a donc un effet bénéfique sur la consolidation de la MRA puisque cette mémoire devient insensible à une seconde privation. Une question importante soulevée par mes résultats de thèse est donc de comprendre pourquoi la privation de sommeil à t_0 renforce la consolidation de la MRA.

- 1^{ère} hypothèse: il est envisageable que la privation de sommeil à t_0 provoque une modification de la qualité de la mémoire qui est formée; une mémoire distincte de la MRA et de la MLT. Nous avons tenté de tester cette hypothèse à travers plusieurs expériences, et nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de telles modifications mnésiques. Il reste néanmoins possible que les outils techniques disponibles à l'heure actuelle pour étudier la mémoire des drosophiles ne nous permettent pas d'invalider totalement cette hypothèse.

- 2nd hypothèse: il a été décrit qu'une privation de sommeil provoque une augmentation du taux d'ecdysone. De plus, la présence d'ecdysone pendant le conditionnement facilite la formation de la MLT. Il est donc envisageable que la privation de sommeil à t_0 provoque une libération d'ecdysone qui favoriserait la consolidation de la mémoire *via* un effet

d'augmentation de la plasticité synaptique. Comme l'étude de l'effet de l'ecdysone sur l'apprentissage a été réalisée avec un protocole de comportement de cour, l'analyse du rôle potentiel de l'ecdysone sur la MRA n'a pas été analysée. Il est donc possible que la libération d'ecdysone pendant ou juste après le conditionnement favorise la formation des mémoires consolidées. Nous pourrions donc inhiber l'expression des récepteurs à l'ecdysone dans les CPs adultes et déterminer si la privation de sommeil à t_0 a toujours un effet bénéfique sur la mémoire.

- Enfin, il a été démontré que la privation de sommeil s'accompagne d'une augmentation des protéines associées aux synapses matures et actives (Gilestro *et al.*, 2009; Wagh *et al.*, 2006). Ainsi, la protéine Bruchpilot (BRP) s'accumule dans le cerveau et en particulier dans les CPs. De plus, cette protéine est requise dans les CPs pour la formation de la MRA (Knappek *et al.*, 2011) (mais pas pour la formation de la MSA). La 3^{ème} hypothèse est donc que la privation à t_0 a un effet bénéfique indirect sur la consolidation de la mémoire *via* l'augmentation des marqueurs synaptiques, tel que BRP, pendant la privation. Les synapses créées pendant le conditionnement seraient renforcées de façon non spécifique par la privation de sommeil à t_0 et seraient ainsi insensibles à une privation ultérieure. La privation de sommeil à t_0 permettrait donc d'améliorer la consolidation, et empêcherait ainsi l'effacement de cette mémoire.

Nous avons testé cette dernière hypothèse en analysant la capacité des drosophiles à oublier l'information du 1^{er} conditionnement lors d'un apprentissage inversé ("*reversal learning*"). Ainsi, nous avons réalisé un 2nd conditionnement après la privation de sommeil à t_0 (avec une inversion du CS+ et du CS-). Cet apprentissage inversé nécessite la concomitance de deux processus: (1) l'extinction de la mémoire liée au CS+ du 1^{er} conditionnement, et (2) l'évitement à l'odeur qui était le CS- lors du 1^{er} conditionnement et qui est le CS+ lors du 2nd. Les résultats de cette expérience démontrent que les drosophiles privées de sommeil à t_0 n'ont pas eu plus de difficulté que les contrôles pour oublier le 1^{er} conditionnement. Cependant, comme le 2nd conditionnement a lieu 20 h après la privation de sommeil, il est envisageable que ce laps de temps assez long (qui contient toute la partie nocturne du cycle) permette aux réseaux neuronaux de retrouver un état de fonctionnement "normal" et donc que l'effet positif de la privation de sommeil à t_0 se soit estompé. Ainsi, pour pouvoir observer les effets de la privation de sommeil à t_0 , il serait peut être nécessaire d'optimiser les conditions expérimentales, par exemple, en réalisant le 2nd conditionnement 3 h seulement après la fin de la privation de sommeil. Si cette hypothèse est validée, cela signifierait que l'effet bénéfique d'une privation de sommeil à t_0 est temporaire.

4. Conclusion générale

En conclusion, les résultats obtenus au cours ma thèse ont permis de mettre en évidence le rôle positif joué par le sommeil pour la consolidation de la MRA. Nous avons aussi identifié une corrélation positive entre le pic d'activité du soir et la compensation, pendant le rappel mnésique, de l'effet délétère d'une privation de sommeil. Enfin, les derniers résultats ont permis de démontrer un effet synergique positif entre les 1^{ères} étapes de consolidation de la mémoire et une privation de 4 h de sommeil.

De multiples évidences indiquent donc que le sommeil joue un rôle positif dans le renforcement des traces de mémoire. Néanmoins, il a récemment été démontré que le sommeil serait aussi important pour la suppression des informations qui ne sont pas importantes et qui doivent être oubliées (Rauchs *et al.*, 2011). Ces deux mécanismes qui interviennent pendant le sommeil seraient donc à la base des processus de consolidation.

L'ensemble de ces expériences démontre l'importance du rythme circadien dans le rappel de mémoires fragilisées. Il pourrait donc être utile pour les expériences mnésiques, même celles sans privation de sommeil, de prendre en compte l'influence potentielle du rythme circadien sur les résultats.

Annexe: DSCAM

Dans cette partie, je vais présenter un projet annexe de ma thèse que je n'ai pas abordé dans l'introduction. Il s'agit de l'analyse du rôle potentiel de la protéine "Down Syndrome Cell Adhesion Molecule" (DSCAM) dans les processus mnésiques. Ce sujet est la poursuite d'un projet initié au laboratoire par Benjamin Kottler lors de sa thèse. Les données présentées ci-après correspondent aux résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse.

1. Brève introduction

Le gène *dscam* code un récepteur transmembranaire de la super famille des immunoglobulines. Le gène *dscam* de la drosophile est particulièrement complexe car il contient 8 exons alternatifs et peut générer 152.064 isoformes (Figure 33) (Schmucker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004a). Bien que cette complexité soit spécifique des invertébrés, la fonction moléculaire de DSCAM semble être conservée des insectes aux mammifères (Schmucker & Chen, 2009). Cette protéine est principalement exprimée dans le système nerveux où elle joue un rôle dans le développement neuronal (pour revue (Hattori *et al.*, 2008)). Elle est requise pour la guidance, la ségrégation et la bifurcation axonale, l'arborisation et l'auto-évitement des dendrites ainsi que pour la formation des synapses.

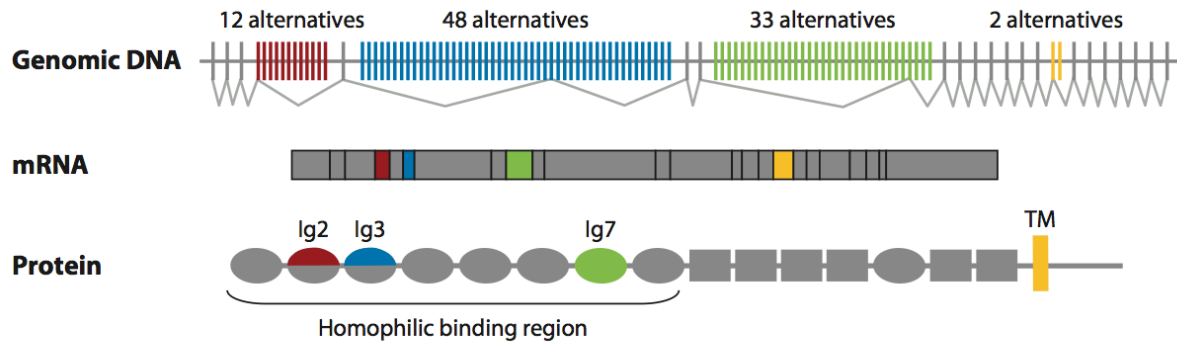


Figure 33 : Schéma de la structure de *dscam*.

(A) Le gène *dscam* contient 6 exons alternatifs qui sont représentés en couleurs. Les exons 19 et 23 qui codent la partie intracellulaire, peuvent ne pas être transcrits. (B) Schéma de la séquence de l'ARNm avec les 4 exons alternatifs. (C) Schéma de la protéine DSCAM avec la partie impliquée dans la liaison homophile qui contient 3 exons alternatifs. (Hattori *et al.*, 2009)

Plusieurs études ont démontré que l'ectodomaine de la protéine ne peut se lier qu'avec un autre ectodomaine identique. Cette liaison homophile de DSCAM provoque la répulsion des neurites. La partie transmembranaire/juxtamembranaire est codée par l'exon alternatif n° 17 (17.1 ou 17.2). Plusieurs études ont révélé que les isoformes contenant la séquence codée par l'exon 17.1 sont préférentiellement exprimées au niveau des dendrites, alors que celles contenant la séquence codée par l'exon 17.2 sont préférentiellement exprimées dans les axones mais aussi au niveau des dendrites (Wang *et al.*, 2004a).

La protéine DSCAM est très étudiée pour son implication dans le développement neuronal, et aucun rôle n'a été décrit à ce jour chez la drosophile adulte. Il est possible que le grand nombre d'isoformes qui peut être généré, combiné à la capacité de liaison homophile des protéines DSCAM soit à la base d'un mécanisme de reconnaissance spécifique pour créer de nouvelles synapses nécessaires à la formation ou la consolidation de la mémoire. Cette hypothèse a été confortée par l'étude de Li *et al.* qui démontre que DSCAM est nécessaire, chez l'aplysie, pour le remodelage des récepteurs au glutamate qui se produit durant la formation de nouvelles synapses liée à la formation de la mémoire (Li *et al.*, 2009a).

Durant sa thèse, Benjamin Kottler a réalisé une construction permettant d'exprimer un ARN interférent (ARNi) spécifique du gène *dscam*. Ses résultats préliminaires suggéraient que l'inhibition du gène *dscam* dans les CPs de mouches adultes affectait spécifiquement la formation de la MTL.

J'ai poursuivi cette étude au début de ma thèse. L'expression du gène *dscam* est inhibée dans les CPs, centre de la mémoire olfactive, en utilisant la technique d'ARN

interférence. Afin de s'affranchir de défauts potentiels d'apprentissage dus à l'expression de l'ARNi pendant le développement, nous avons utilisé l'activateur conditionnel "Gal4-Switch" (Roman *et al.*, 2001) sous le contrôle soit des séquences MB247 (*MB-Switch*). L'induction de l'expression de l'ARNi avec le système Switch débute 48 h avant l'expérience en plaçant les mouches sur un milieu contenant du RU486.

Pour réaliser les expériences de comportement, il est nécessaire de placer l'élément-P contenant l'ARNi dans le fond génétique de notre souche de référence CS car le fond génétique influence beaucoup les résultats. Nous avons donc homogénéisé le fond génétique des différentes lignées utilisées dans cette étude en réalisant trois croisements successifs avec la souche w^{118} (voir matériels et méthodes).

2. Résultats

La 1^{ère} séquence ARNi utilisée, ARNi-D1, a été construite par B. Kottler durant sa thèse. Cette séquence cible l'exon constitutif n° 11, elle inhibe donc l'expression de tous les transcrits du gène *dscam*.

a) Validation de l'efficacité de l'ARNi-D1

Afin de valider l'efficacité de cette construction, nous avons analysé par RT-qPCR la quantité relative d'ARNm de *dscam* présente dans les têtes de drosophiles où l'ARNi est exprimé pendant 48 h dans tous les neurones *via* le pilote d'expression *Elav-Switch*. Il s'agit d'une quantification relative car nous utilisons un gène de référence dont le niveau d'expression est constant, et qui est l'alpha tubuline. Le contrôle (*Elav-Switch/+*) nous permet de déterminer le niveau basal d'expression du gène *dscam*. Le second génotype (*Elav-Switch/UAS^{GAL4}-ARNi*) nous permet de calculer un ratio qui nous indique si le niveau d'expression de *dscam* est modifié lorsque la séquence ARNi est exprimée.

La quantité relative d'ARNm de *dscam* est diminuée de 23% lorsque l'expression de la séquence ARNi est contrôlée par le pilote d'expression *Elav-Switch*. La séquence ARNi cible donc efficacement l'ARNm de *dscam*. De plus, nous avons pu constater que l'expression constitutive de l'ARNi *via* le pilote d'expression pan-neuronal (*Elav-Gal4*) empêche la sortie des drosophiles de leurs pupes, elles meurent pendant le dernier stade larvaire. Cette observation confirme l'efficacité de l'ARNi car le mutant mutant *Dscam^{null}* est létal à l'état homozygote (Hattori *et al.*, 2007).

b) Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de *dscam* sur la MLT

Nous avons ensuite analysé l'effet sur la MLT de l'inhibition de l'expression de *dscam* dans le cerveau à l'aide du pilote d'expression *Elav-Switch*. L'inhibition de l'expression de *dscam* dans les neurones adultes provoque un défaut de MLT Figure 34.

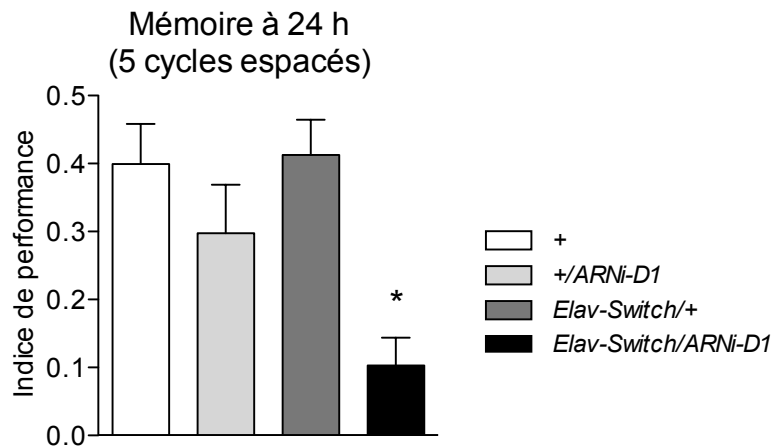


Figure 34 : Etude de la MLT avec le pilote d'expression *Elav-Switch*.

L'indice de performance est mesuré 24 h après un conditionnement espacé. Les drosophiles *Elav-Switch/ARNi-D1* présentent une mémoire statistiquement plus faible que leurs contrôles. $F_{2,8} = 4,675$; $P = 0,03$; one way ANOVA, $n \geq 3$. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Pour une étude plus spécifique, nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition de l'expression de *dscam* dans les CPs adultes à l'aide du pilote d'expression *MB-Switch*. Dans ce cas, les drosophiles présentent aussi un défaut de MLT par rapport aux contrôles (Figure 35).

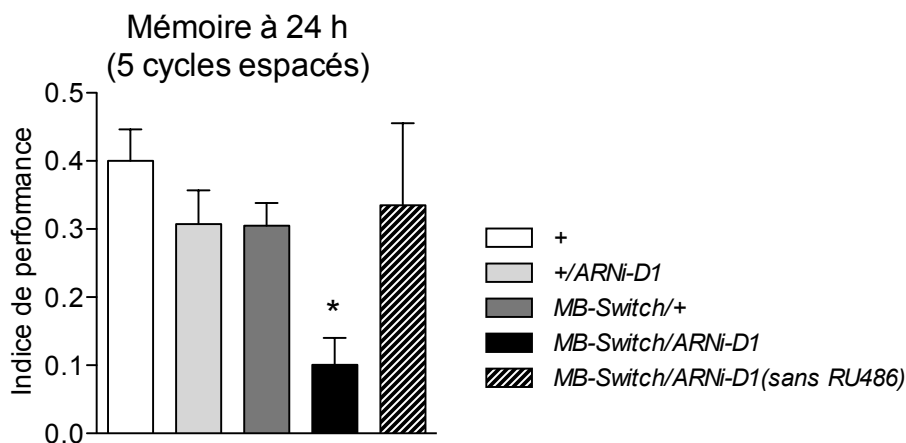


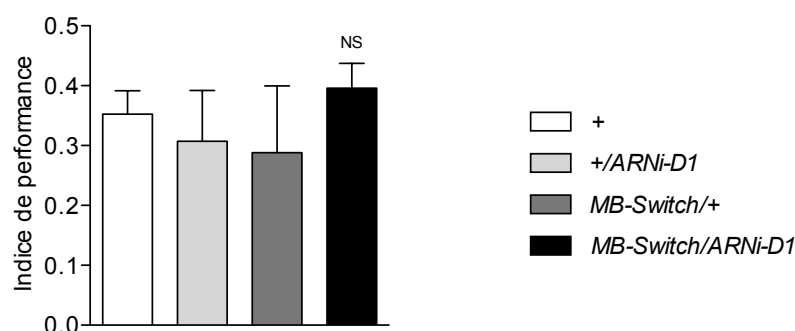
Figure 35 : Etude de la MLT avec le pilote d'expression *MB-Switch*.

L'indice de performance est mesuré 24 h après un conditionnement espacé. Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-D1* présentent un indice de performance statistiquement plus faible que leurs contrôles. Le groupe contrôle *MB-Switch/ARNi-D1*(sans RU486) correspond à des drosophiles qui n'ont pas été placées sur du milieu contenant du RU486 pendant l'expérience. $F_{3,34} = 5,146$; $P = 0,005$; one way ANOVA, $n \geq 10$ et $n = 4$ pour *MB-Switch/ARNi-D1*(sans RU486). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

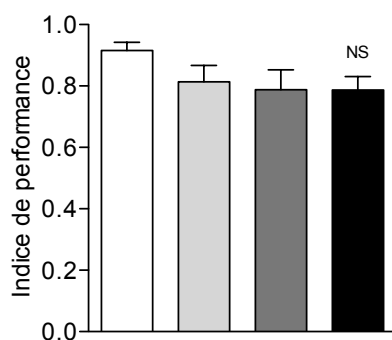
c) Contrôles de comportement

Afin de s'assurer que le défaut de mémoire observé est bien dû à un défaut mnésique et non sensoriel, nous avons testé l'olfaction et la sensibilité aux chocs électriques de ces drosophiles. Les résultats présentés dans la Figure 36-A indiquent que les drosophiles qui expriment le ARNi-D1 (*MB-Switch/RNAi-D1*) sont capables de ressentir les chocs électriques. De plus, elles n'ont pas de problème pour sentir les odeurs présentées pendant le conditionnement (Figure 36-B,C).

A Evitement aux chocs électriques



B Olfaction Octanol



C Olfaction méthylcyclohexanol

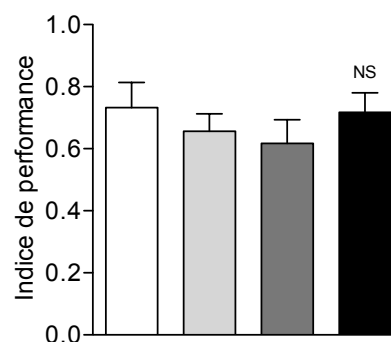


Figure 36 : Contrôles de l'évitement des chocs électriques, et de l'olfaction.

(A) Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-D1* ne présentent pas de défaut d'évitement des chocs électriques. $F_{2,16} = 0,531$; $P = 0,58$; one way ANOVA, $n \geq 6$. (B) Les mouches sont soumises simultanément au méthylcyclohexanol et à des chocs électriques, leur évitement de l'octanol est mesuré une minute après. Aucune différence significative n'est détectée. $F_{2,19} = 0,082$; $P = 0,92$; one way ANOVA, $n \geq 6$. (C) Les mouches sont soumises simultanément à l'octanol et à des chocs électriques, leur évitement du méthylcyclohexanol est mesuré une minute après. Aucune différence significative n'est détectée. $F_{2,33} = 0,591$; $P = 0,56$; one way ANOVA, $n = 12$. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

En conclusion, les mouches exprimant l'ARNi-D1 dans les CPs adultes présentent un défaut de MLT.

d) Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de *dscam* sur la MCT et la MRA

Afin de déterminer si la protéine DSCAM est requise spécifiquement pour la MLT, nous avons analysé l'effet de l'inhibition de l'expression de *dscam* dans les CPs de drosophiles adultes sur la MRA et la MCT. Comme on peut le constater sur la Figure 37, l'inhibition de l'expression de *dscam* dans les CPs adultes ne provoque ni de défaut de MRA ni de MCT.

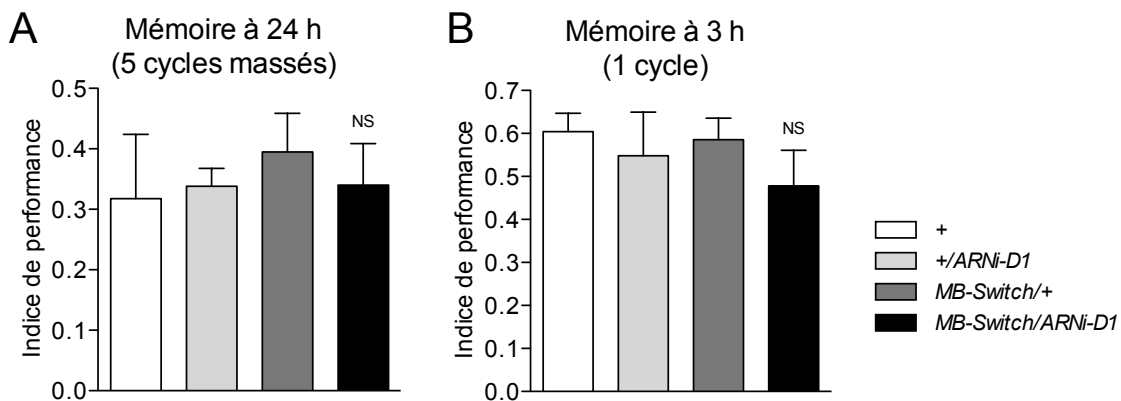


Figure 37 : L'inhibition de l'expression de *dscam* dans les CPs ne provoque pas de défauts de MRA ou de MCT.

(A) L'indice de performance est mesuré 24 h après un conditionnement massé. Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-D1* ne présentent pas de défaut de mémoire. $F_{2,11} = 0,307$; $P = 0,74$; one way ANOVA, $n \geq 4$. (B) L'indice de performance est mesuré 3 h après un cycle de conditionnement. Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-D1* ne présentent pas de défaut de mémoire. $F_{2,20} = 0,567$; $P = 0,58$; one way ANOVA, $n \geq 6$. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que pour les processus mnésiques, la protéine DSCAM est spécifiquement nécessaire au niveau des CPs adultes pour la MLT.

e) Constructions ARNi supplémentaires

On ne peut exclure que le défaut de MLT observé avec l'ARNi-D1 ne soit pas spécifique de la cible *dscam*. En effet, même si les logiciels informatiques ne prédisent aucune cible parfaite (aucun mis-appariement de la séquence ARNi avec sa cible) autre que la cible d'intérêt, il reste possible qu'une telle cible non spécifique existe ("off-target"). Ainsi il était nécessaire pour valider nos résultats d'utiliser une autre séquence ARNi. Le "Vienna *Drosophila Rnai Center*" est une banque de lignées de drosophile contenant des séquences UAS^{GAL4}-ARNi ciblant à peu près tous les gènes de la drosophile. La lignée n° 3115 possède une séquence ARNi ciblant spécifiquement l'exon constitutif n° 11 de l'ARNm de *dscam*. De manière intéressante, cette séquence ARNi possède un chevauchement très restreint avec celle de l'ARNi-D1 (34 nucléotides).

Nous avons également réalisé une nouvelle construction ARNi ciblant l'exon constitutif n° 7 de l'ARNm de *dscam*. Le plasmide correspondant a été injecté dans des embryons de drosophile par la société "Best Gene" et 10 transformants ont été obtenus (D3-1 à D3-10).

f) Validation de l'efficacité des ARNi-3115 et ARNi-D3-x

Après avoir homogénéisé le fond génétique des différentes lignées ARNi, nous avons vérifié l'efficacité de l'expression de ces séquences sur celle du gène *dscam* par RT-qPCR à l'aide du pilote d'expression inductible *Elav-Switch*. Nous avons ainsi pu valider l'efficacité de l'ARNi n° 3115 à inhiber l'expression de *dscam* (baisse de 22%), ainsi que celle de la séquence D3-5 (baisse de 32%).

Pour l'étude fonctionnelle, nous avons utilisé ces 2 lignées que nous avons croisées avec la lignée contenant le pilote d'expression *MB-Switch*. Comme on peut le constater sur la Figure 38, l'expression de ces ARNi dans les CPs ne génère pas de défaut de MLT.

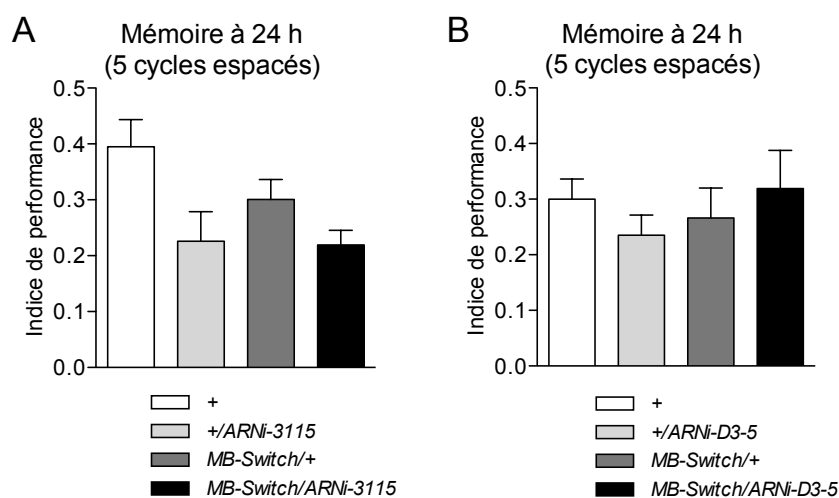


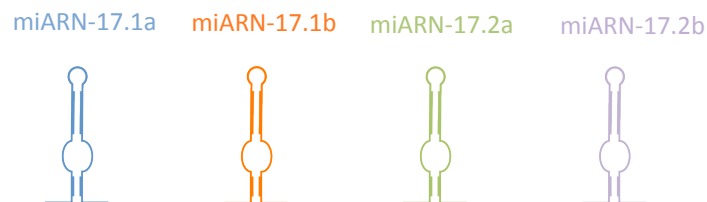
Figure 38 : L'induction des ARNi-3115 ou ARNi-D3-5 ne provoque pas de défaut de MLT. L'indice de performance est mesuré 24 h après un conditionnement espacé. (A) Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-3115* ne présentent pas de défaut de mémoire. $F_{2,31} = 1,470$; $P = 0,24$; one way ANOVA, $n \geq 10$. (B) Les drosophiles *MB-Switch/ARNi-D3-5* ne présentent pas de défaut de mémoire. $F_{2,30} = 0,602$; $P = 0,55$; one way ANOVA, $n \geq 7$. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

g) Inhibition de l'expression des isoformes axonales ou dendritiques: utilisation de séquences miARN

Nous avons utilisé la technique des miARN afin d'inhiber l'expression d'isoformes spécifiques de *dscam*. Ces miARN, ne sont constitués que de 19 nucléotides (comparé aux

100^{aines} de nucléotides des ARNi "classiques"). Ils sont donc beaucoup plus spécifiques que les ARNi classiques, ce qui limite le risque de "off-target". De plus, leur petite taille permet de cibler de petits exons. Les séquences miARN sont insérées en tandem dans un plasmide sous le contrôle des séquences UAS^{GAL4}. Deux séquences différentes spécifiques de l'exon 17.1 ont été construites et insérées en tandem dans le plasmide-pNE3 (Figure 39) ((Birmingham *et al.*, 2007; Haley *et al.*, 2008)). Nous avons ensuite réalisé le même type de construction afin de cibler l'exon 17.2. Enfin, nous avons réalisé une dernière construction contenant un miARN spécifique de l'exon 17.1 et un second ciblant l'exon 17.2. Cette construction permet donc d'inhiber l'expression de toutes les isoformes issues du gène *dscam*.

Séquences miRNA :



Constructions :

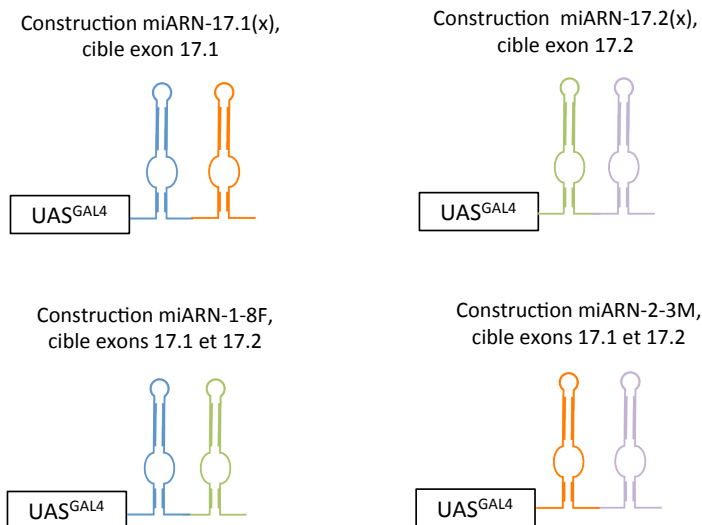


Figure 39 : Schéma des constructions miARN.

Représentation schématique des constructions de séquences miARN. Les miARN-17.1a et 17.1b ciblent l'exon alternatif 17.1 de *dscam*. Les miARN-17.2a et 17.2b ciblent l'exon alternatif 17.2 de *dscam*. Les séquences construites sont ensuite placées en tandem en aval des séquences UAS^{GAL4}.

Après génération des lignées et homogénéisation du fond génétique, nous avons vérifié par RT-qPCR l'efficacité de 5 d'entre elles en analysant, après croisement avec le pilote d'expression *Elav-Gal4*, la quantité de transcrits contenant soit l'exon 17.1 soit l'exon 17.2. Comme on peut le constater sur le Tableau 3, ces séquences miARN sont bien

spécifiques des transcrits ciblés. On observe également que l'inhibition de l'expression des transcrits contenant l'exon 17.1 provoque une augmentation significative des ARNm contenant l'exon 17.2. Inversement, l'inhibition des transcrits contenant l'exon 17.2 n'a pas d'effet significatif sur l'expression des transcrits contenant l'exon 17.1. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les isoformes qui contiennent l'exon 17.1 sont préférentiellement exprimées au niveau des dendrites alors que celles qui contiennent l'exon 17.2 sont exprimées dans les axones mais aussi dans les dendrites. Il semble donc que l'inhibition de l'expression des transcrits contenant l'exon 17.1 soit compensée par une augmentation des transcrits contenant l'exon 17.2. Cette hypothèse est renforcée par le fait que seule l'inhibition des transcrits 17.2 pendant le stade larvaire (pilote d'expression *Elav-Gal4*) induit un retard de développement des drosophiles de 2-3 jours.

Pour les analyses fonctionnelles, nous avons utilisé les miARN-17.1(9) et 17.2(9) qui provoquent une forte baisse de l'expression des transcrits 17.1 et 17.2, respectivement.

		Type de transcrit mesuré	
		17.1	17.2
Cible l'exon 17.1	miARN-17.1(3)	0.64	1.28
	miARN-17.1(6)	0.47	1.30
	miARN-17.1(7)	0.43	ND
	miARN-17.1(9)	0.40	ND
	miARN-17.1(10)	0.43	ND
Cible l'exon 17.2	miARN-17.2(1)	ND	0.53
	miARN-17.2(3)	ND	0.53
	miARN-17.2(5)	0.88	0.67
	miARN-17.2(9)	0.94	0.44

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats de PCR-quantitative.

Tableau représentant le ratio *dscam*/tubuline mesuré pour le transcrit 17.1 ou 17.2 en fonction du miARN qui est exprimé par le pilote d'expression *Elav-Gal4*. ND, mesure non réalisée.

Nous avons testé 2 de ces lignées avec le driver *MB-Switch* en comportement. Comme on peut le voir sur la Figure 40, l'inhibition de l'expression de l'isoforme contenant l'exon 17.1 (construction 17.1(9)) ou 17.2 (construction 17.2(9)) dans les CPs de mouches adultes ne provoque pas de défaut de MLT. Ces résultats suggèrent que les isoformes axonales ne sont pas nécessaires pour la formation de la MLT. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur

l'implication des isoformes dendritiques car il est possible que l'inhibition de l'isoforme 17.1 soit compensée physiologiquement par la surexpression de l'isoforme 17.2.

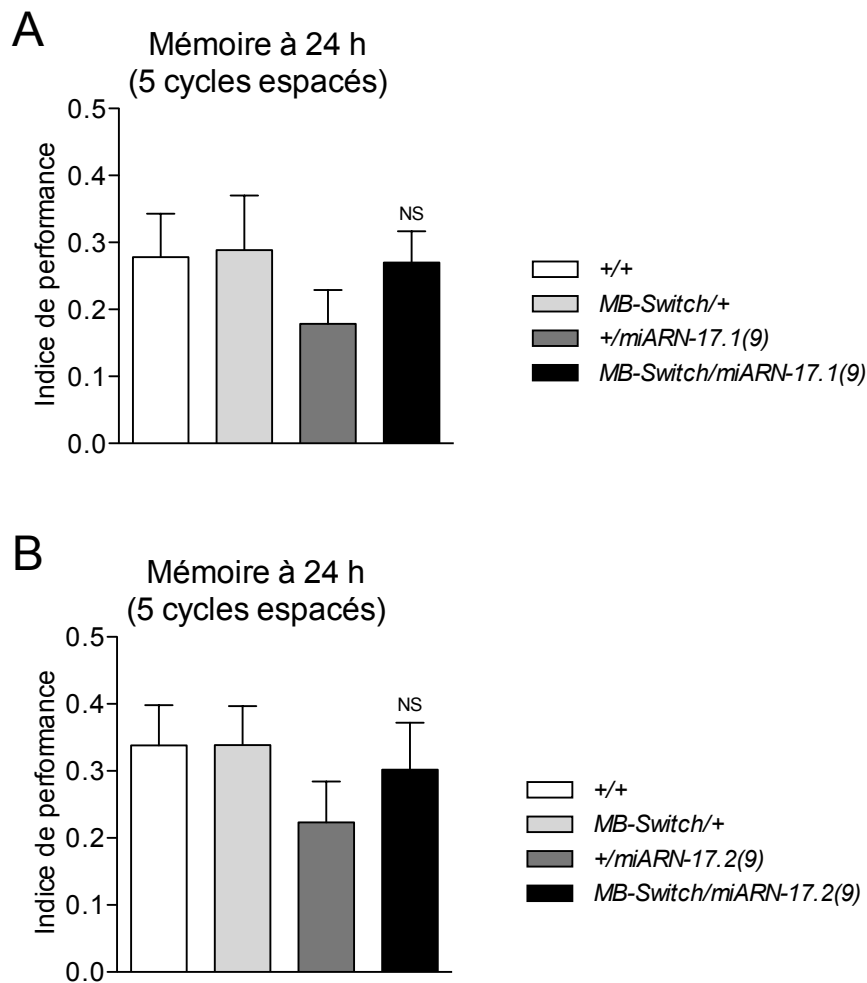


Figure 40 : L'induction du miARN-17.1(9) ou miARN-17.2(9) dans les CPs ne provoque pas de défaut de MLT.

Les indices de performance sont mesurés 24 h après un conditionnement espacé. **(A)** L'inhibition de l'expression des transcrits de *dscam* contenant l'exon 17.1 ne provoque pas de défaut de MLT. $F_{2,33} = 0,919$; $P = 0,41$; one way ANOVA, $n \geq 11$. **(B)** L'inhibition de l'expression des transcrits de *dscam* contenant l'exon 17.2 ne provoque pas de défaut de MLT. $F_{2,32} = 0,849$; $P = 0,44$; one way ANOVA, $n \geq 11$. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Pour finir, nous avons testé deux lignées (miARN-1-8F et miARN-2-3M) contenant chacune 2 miARN, l'un ciblant l'exon 17.1 et l'autre ciblant l'exon 17.2. Dans ce cas, l'expression de tous les transcrits de *dscam* est inhibée. L'expression de ces deux miARN ne provoque pas de défaut de MLT lorsqu'ils sont exprimés dans les CPs adultes (Figure 41).

Il est possible que ces constructions ne soient pas assez efficaces pour inhiber les transcrits *dscam* 17.1 et 17.2, respectivement. En effet, ces constructions ne contiennent

qu'une seule séquence miARN ciblant l'exon 17.1, et une seule ciblant le 17.2. Ainsi, il serait utile de vérifier avec des expériences de RT-qPCR l'expression des ARNm de *dscam*.

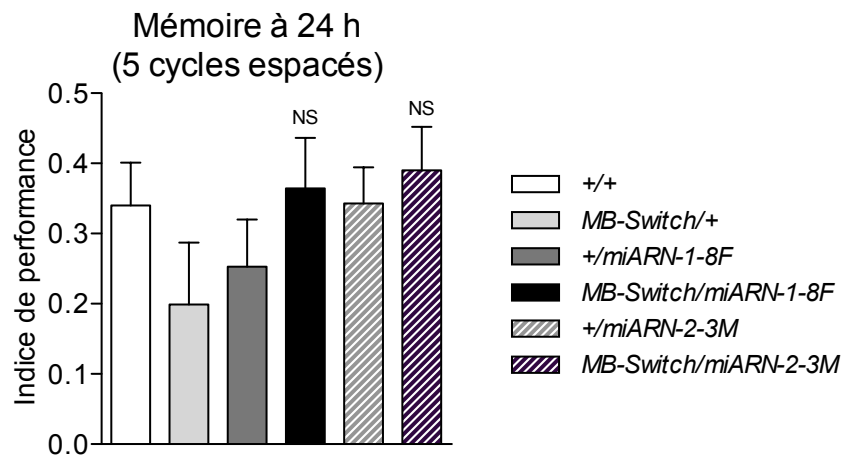


Figure 41 : L'induction des miARN_1-8F ou miARN_2-3M ne provoque pas de défaut de MLT. Les indices de performance sont mesurés 24 h après un conditionnement espacé. Les constructions miARN-1-8F et miARN-2-3M ciblent tous les transcrits de *dscam*. L'inhibition de l'expression des tous les transcrits de *dscam* dans les CPs ne provoque pas de défaut de MLT. (pour le miARN-1-8F: $F_{2,30} = 1,230$, $P = 0,31$; one way ANOVA, $n = 11$; pour le miARN-2-3M: $F_{2,28} = 2,012$, $P = 0,15$; one way ANOVA, $n \geq 10$). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

3. Conclusions

Les résultats obtenus avec le premier ARNi-D1 ont permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus par B. Kottler. L'inhibition de l'expression de *dscam* dans les CPs à l'aide de cette séquence ARNi provoque un défaut spécifique de MLT. Cependant, en exprimant les 2 séquences ARNi supplémentaires (3115 et D3-5), et les 2 constructions miARN (1-8F et 2-3M), nous n'avons pas observé de défaut de MLT.

Plusieurs hypothèses pourraient permettre d'expliquer ces résultats: (i) il est envisageable que le défaut de MLT obtenu avec la séquence ARNi-D1 soit du à un "off-target". Ainsi, ce serait l'inhibition de l'expression d'un autre gène que *dscam* qui provoquerait un défaut de mémoire. Même si les analyses *in-silico* suggèrent que la séquence ARNi-D1 ne cible pas de "off-target", cette hypothèse ne peut pas être exclue. (ii) Les séquences ARNi 3115, D3-5 et miARN-1-8F, miARN-2-3M ne sont pas assez efficaces pour inhiber l'expression de *dscam*. Il est à noter que les données de RT-qPCR ont été obtenues à partir de mouches exprimant les constructions d'ARNi sous le contrôle du pilote Elav-Switch. Ainsi

ces données ne nous renseignent pas sur l'expression des ARNm de *dscam* dans les géotypes utilisés pour le comportement, et encore moins sur leur expression dans les CPs. Il serait donc nécessaire de déterminer précisément l'efficacité des séquences ARNi ou miARN que nous avons utilisées avant d'envisager de poursuivre ce projet. Il pourrait également être utile d'analyser l'effet de l'expression de ces séquences ARNi sous le contrôle du pilote Elav-Switch.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackerman S. L., Siegel R. W. Chemically reinforced conditioned courtship in *Drosophila*: responses of wild-type and the dunce, amnesiac and don giovanni mutants. *J Neurogenet*, 1986, 3, p. 111-123
- Akalal D. B., Yu D., Davis R. L. A late-phase, long-term memory trace forms in the gamma neurons of *Drosophila* mushroom bodies after olfactory classical conditioning. *J Neurosci*, 2010, 30, p. 16699-16708
- Akalal D. B., Yu D., Davis R. L. The Long-Term Memory Trace Formed in the *Drosophila* α/β Mushroom Body Neurons Is Abolished in Long-Term Memory Mutants. *J Neurosci*, 2011, 31, p. 5643-5647
- Aso Y., Siwanowicz I., Bracker L., Ito K., Kitamoto T., Tanimoto H. Specific Dopaminergic Neurons for the Formation of Labile Aversive Memory. *Curr Biol*, 2010,
- Bacskai B. J., Hochner B., Mahaut-Smith M., Adams S. R., Kaang B. K., Kandel E. R., Tsien R. Y. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*, 1993, 260, p. 222-226
- Banerjee P., Schoenfeld B. P., Bell A. J., Choi C. H., Bradley M. P., Hinchey P., Kollaros M., *et al.* Short- and long-term memory are modulated by multiple isoforms of the fragile X mental retardation protein. *J Neurosci*, 2010, 30, p. 6782-6792
- Beck C. D., Schroeder B., Davis R. L. Learning performance of normal and mutant *Drosophila* after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *J Neurosci*, 2000, 20, p. 2944-2953
- Bender M., Imam F. B., Talbot W. S., Ganetzky B., Hogness D. S. *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell*, 1997, 91, p. 777-788
- Berry J., Krause W. C., Davis R. L. Chapter 18 Olfactory memory traces in *Drosophila*. *Prog Brain Res*, 2008, 169, p. 293-304
- Birmingham A., Anderson E., Sullivan K., Reynolds A., Boese Q., Leake D., Karpilow J., *et al.* A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nature protocols*, 2007, 2, p. 2068-2078
- Borbely A. A. Sleep regulation. Introduction. *Human neurobiology*, 1982, 1, p. 161-162
- Boyden E. S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 2005, 8, p. 1263-1268
- Bushey D., Huber R., Tononi G., Cirelli C. *Drosophila* Hyperkinetic mutants have reduced sleep and impaired memory. *Journal of Neuroscience*, 2007, 27, p. 5384-5393
- Bushey D., Tononi G., Cirelli C. The *Drosophila* fragile X mental retardation gene regulates sleep need. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2009, 29, p. 1948-1961
- Bushey D., Tononi G., Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: structural evidence in *Drosophila*. *Science*, 2011, 332, p. 1576-1581
- Buzsaki G., Chen L. S., Gage F. H. Spatial organization of physiological activity in the hippocampal region: relevance to memory formation. *Progress in brain research*, 1990, 83, p. 257-268
- Byers D., Davis R. L., Kiger J. A., Jr. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1981, 289, p. 79-81

- Chabaud M. A., Isabel G., Kaiser L., Preat T. Social Facilitation of Long-Lasting Memory Retrieval in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2009, p. 1654-1659
- Chang D. C. Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural processes*, 2006, 71, p. 211-225
- Chang K. T., Shi Y. J., Min K. T. The *Drosophila* homolog of Down's syndrome critical region 1 gene regulates learning: implications for mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, p. 15794-15799
- Chatterjee A., Tanoue S., Houl J. H., Hardin P. E. Regulation of gustatory physiology and appetitive behavior by the *Drosophila* circadian clock. *Current biology : CB*, 2010, 20, p. 300-309
- Chaudhury D., Colwell C. S. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural brain research*, 2002, 133, p. 95-108
- Chen C. C., Wu J. K., Lin H. W., Pai T. P., Fu T. F., Wu C. L., Tully T., *et al.* Visualizing long-term memory formation in two neurons of the *Drosophila* brain. *Science*, 2012, 335, p. 678-685
- Cirelli C. Searching for sleep mutants of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 2003, 25, p. 940-949
- Cirelli C., Bushey D., Hill S., Huber R., Kreber R., Ganetzky B., Tononi G. Reduced sleep in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature*, 2005a, 434, p. 1087-1092
- Cirelli C., Gutierrez C. M., Tononi G. Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron*, 2004, 41, p. 35-43
- Cirelli C., LaVaute T. M., Tononi G. Sleep and wakefulness modulate gene expression in *Drosophila*. *J Neurochem*, 2005b, 94, p. 1411-1419
- Cirelli C., Tononi G. Is sleep essential? *PLoS Biol*, 2008, 6, p. e216
- Comas D., Petit F., Preat T. *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature*, 2004, 430, p. 460-463
- Comery T. A., Harris J. B., Willems P. J., Oostra B. A., Irwin S. A., Weiler I. J., Greenough W. T. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94, p. 5401-5404
- Connolly J. B., Roberts I. J., Armstrong J. D., Kaiser K., Forte M., Tully T., O'Kane C. J. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science*, 1996, 274, p. 2104-2107
- 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, p. 38-51
- Crocker A., Sehgal A. Genetic analysis of sleep. *Genes Dev*, 2010, 24, p. 1220-1235
- Davis R. L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, 2005, 28, p. 275-302
- de Belle J. S., Heisenberg M. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, 1994, 263, p. 692-695
- Diekelmann S., Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11, p. 114-126
- Donlea J. M., Thimgan M. S., Suzuki Y., Gottschalk L., Shaw P. J. Inducing sleep by remote control facilitates memory consolidation in *Drosophila*. *Science*, 2011, 332, p. 1571-1576
- Drain P., Folkers E., Quinn W. G. cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron*, 1991, 6, p. 71-82
- Drier E. A., Tello M. K., Cowan M., Wu P., Blace N., Sacktor T. C., Yin J. C. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci*, 2002, 5, p. 316-324

- Drummond S. P., Brown G. G. The effects of total sleep deprivation on cerebral responses to cognitive performance. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2001, 25, p. S68-73
- Drummond S. P., Brown G. G., Gillin J. C., Stricker J. L., Wong E. C., Buxton R. B. Altered brain response to verbal learning following sleep deprivation. *Nature*, 2000, 403, p. 655-657
- Dubnau J., Chiang A. S., Grady L., Barditch J., Gossweiler S., McNeil J., Smith P., *et al.* The *stufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Current biology : CB*, 2003, 13, p. 286-296
- Dubnau J., Grady L., Kitamoto T., Tully T. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 2001, 411, p. 476-480
- Dudai Y., Jan Y. N., Byers D., Quinn W. G., Benzer S. *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73, p. 1684-1688
- Dura J. M., Preat T., Tully T. Identification of *linotte*, a new gene affecting learning and memory in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*, 1993, 9, p. 1-14
- Ejima A., Smith B. P., Lucas C., Levine J. D., Griffith L. C. Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Curr Biol*, 2005, 15, p. 194-206
- Fernandez R. I., Lyons L. C., Levenson J., Khabour O., Eskin A. Circadian modulation of long-term sensitization in *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100, p. 14415-14420
- Ferris J., Ge H., Liu L., Roman G. G(o) signaling is required for *Drosophila* associative learning. *Nat Neurosci*, 2006, 9, p. 1036-1040
- Fiala A., Spall T. In vivo calcium imaging of brain activity in *Drosophila* by transgenic *cameleon* expression. *Sci STKE*, 2003, 2003, p. PL6
- Folkers E., Drain P., Quinn W. G. *Radish*, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, p. 8123-8127
- Folkers E., Waddell S., Quinn W. G. The *Drosophila* *radish* gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, p. 17496-17500
- Ganguly-Fitzgerald I., Donlea J., Shaw P. J. Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science*, 2006, 313, p. 1775-1781
- Ge X., Hannan F., Xie Z., Feng C., Tully T., Zhou H., Zhong Y. Notch signaling in *Drosophila* long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, p. 10172-10176
- Gerstner J. R., Lyons L. C., Wright K. P., Jr., Loh D. H., Rawashdeh O., Eckel-Mahan K. L., Roman G. W. Cycling behavior and memory formation. *J Neurosci*, 2009, 29, p. 12824-12830
- Gervasi N., Tchenio P., Preat T. PKA Dynamics in a *Drosophila* Learning Center: Coincidence Detection by Rutabaga Adenylyl Cyclase and Spatial Regulation by *Dunce* Phosphodiesterase. *Neuron*, 2010, 65, p. 516-529
- Gilestro G. F., Tononi G., Cirelli C. Widespread changes in synaptic markers as a function of sleep and wakefulness in *Drosophila*. *Science*, 2009, 324, p. 109-112
- Goguel V., Belair A. L., Ayaz D., Lampin-Saint-Amaux A., Scaplehorn N., Hassan B. A., Preat T. *Drosophila* amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *J Neurosci*, 2011, 31, p. 1032-1037
- Goodwin S. F., Del Vecchio M., Velinzon K., Hogel C., Russell S. R., Tully T., Kaiser K. Defective learning in mutants of the *Drosophila* gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci*, 1997, 17, p. 8817-8827

- Graves L. A., Heller E. A., Pack A. I., Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learning & memory*, 2003, 10, p. 168-176
- Grima B., Chelot E., Xia R., Rouyer F. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 2004, 431, p. 869-873
- Guan Z., Peng X., Fang J. Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain research*, 2004, 1018, p. 38-47
- Hairston I. S., Little M. T., Scanlon M. D., Barakat M. T., Palmer T. D., Sapolsky R. M., Heller H. C. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *Journal of neurophysiology*, 2005, 94, p. 4224-4233
- Haley B., Hendrix D., Trang V., Levine M. A simplified miRNA-based gene silencing method for *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 2008, 321, p. 482-490
- Hamada F. N., Rosenzweig M., Kang K., Pulver S. R., Ghezzi A., Jegla T. J., Garrity P. A. An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature*, 2008, 454, p. 217-220
- Han K. A., Millar N. S., Grotewiel M. S., Davis R. L. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron*, 1996, 16, p. 1127-1135
- Han P. L., Levin L. R., Reed R. R., Davis R. L. Preferential expression of the *Drosophila* rutabaga gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron*, 1992, 9, p. 619-627
- Harbison S. T., Mackay T. F., Anholt R. R. Understanding the neurogenetics of sleep: progress from *Drosophila*. *Trends Genet*, 2009, p. 262-269
- Harrison Y., Horne J. A. The impact of sleep deprivation on decision making: a review. *Journal of experimental psychology. Applied*, 2000, 6, p. 236-249
- Hattori D., Demir E., Kim H. W., Viragh E., Zipursky S. L., Dickson B. J. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature*, 2007, 449, p. 223-227
- Hattori D., Millard S. S., Wojtowicz W. M., Zipursky S. L. Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 2008, 24, p. 597-620
- Heisenberg M., Borst A., Wagner S., Byers D. *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet*, 1985, 2, p. 1-30
- Helfrich-Forster C. The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92, p. 612-616
- Hendricks J. C., Finn S. M., Panckeri K. A., Chavkin J., Williams J. A., Sehgal A., Pack A. I. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, 2000, 25, p. 129-138
- Hendricks J. C., Williams J. A., Panckeri K., Kirk D., Tello M., Yin J. C., Sehgal A. A non-circadian role for cAMP signaling and CREB activity in *Drosophila* rest homeostasis. *Nat Neurosci*, 2001, 4, p. 1108-1115
- Hewes R. S. The buzz on fly neuronal remodeling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2008, 19, p. 317-323
- Hinton V. J., Brown W. T., Wisniewski K., Rudelli R. D. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *American journal of medical genetics*, 1991, 41, p. 289-294
- Hiroi M., Marion-Poll F., Tanimura T. Differentiated response to sugars among labellar chemosensilla in *Drosophila*. *Zoological science*, 2002, 19, p. 1009-1018

- Ho I. S., Hannan F., Guo H. F., Hakker I., Zhong Y. Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci*, 2007, 27, p. 6852-6857
- Ho K. S., Sehgal A. *Drosophila melanogaster*: an insect model for fundamental studies of sleep. *Methods in enzymology*, 2005, 393, p. 772-793
- Horiuchi J., Yamazaki D., Naganos S., Aigaki T., Saitoe M. Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105, p. 20976-20981
- Houl J. H., Yu W., Dudek S. M., Hardin P. E. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. *J Biol Rhythms*, 2006, 21, p. 93-103
- Huber R., Hill S. L., Holladay C., Biesiadecki M., Tononi G., Cirelli C. Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Sleep*, 2004, 27, p. 628-639
- Ikeda S. R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 1996, 380, p. 255-258
- Irwin S. A., Idupulapati M., Gilbert M. E., Harris J. B., Chakravarti A. B., Rogers E. J., Crisostomo R. A., *et al.* Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *American journal of medical genetics*, 2002, 111, p. 140-146
- Isabel G., Pascual A., Preat T. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science*, 2004, 304, p. 1024-1027
- Ishimoto H., Kitamoto T. The steroid molting hormone Ecdysone regulates sleep in adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2010, 185, p. 269-281
- Ishimoto H., Sakai T., Kitamoto T. Ecdysone signaling regulates the formation of long-term courtship memory in adult *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106, p. 6381-6386
- Ito K., Okada R., Tanaka N. K., Awasaki T. Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microscopy research and technique*, 2003, 62, p. 170-186
- Ito K., Suzuki K., Estes P., Ramaswami M., Yamamoto D., Strausfeld N. J. The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem*, 1998, 5, p. 52-77
- Joiner W. J., Crocker A., White B. H., Sehgal A. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature*, 2006, 441, p. 757-760
- Kandel E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 2001, 294, p. 1030-1038
- Kaneko M., Hall J. C. Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *The Journal of comparative neurology*, 2000, 422, p. 66-94
- Kelleher R. J., 3rd, Govindarajan A., Jung H. Y., Kang H., Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 2004, 116, p. 467-479
- Kidd S., Lieber T., Young M. W. Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genes & development*, 1998, 12, p. 3728-3740
- Killgore W. D. Effects of sleep deprivation on cognition. *Progress in brain research*, 2010, 185, p. 105-129
- Kim Y. C., Lee H. G., Han K. A. D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci*, 2007, 27, p. 7640-7647

- Kim Y. C., Lee H. G., Seong C. S., Han K. A. Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns*, 2003, 3, p. 237-245
- Kitamoto T. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J Neurobiol*, 2001, 47, p. 81-92
- Knappek S., Gerber B., Tanimoto H. Synapsin is selectively required for anesthesia-sensitive memory. *Learn Mem*, 2010, 17, p. 76-79
- Knappek S., Sigrist S., Tanimoto H. Bruchpilot, a synaptic active zone protein for anesthesia-resistant memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011, 31, p. 3453-3458
- Koh K., Evans J. M., Hendricks J. C., Sehgal A. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103, p. 13843-13847
- Konopka R. J., Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971, 68, p. 2112-2116
- Kottler B., Lampin-Saint-Amaux A., Comas D., Preat T., Goguel V. Debra, a protein mediating lysosomal degradation, is required for long-term memory in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 2011, 6, p. e25902
- 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, p. 103-115
- Krishnan B., Dryer S. E., Hardin P. E. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1999, 400, p. 375-378
- Lee P. T., Lin H. W., Chang Y. H., Fu T. F., Dubnau J., Hirsh J., Lee T., *et al.* Serotonin-mushroom body circuit modulating the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108, p. 13794-13799
- Levin L. R., Han P. L., Hwang P. M., Feinstein P. G., Davis R. L., Reed R. R. The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, 1992, 68, p. 479-489
- Levine J. D., Funes P., Dowse H. B., Hall J. C. Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2002, 298, p. 2010-2012
- Li H. L., Huang B. S., Vishwasrao H., Suttedja N., Chen W., Jin I., Hawkins R. D., *et al.* Dscam mediates remodeling of glutamate receptors in *Aplysia* during de novo and learning-related synapse formation. *Neuron*, 2009a, 61, p. 527-540
- Li W., Tully T., Kalderon D. Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem*, 1996, 2, p. 320-333
- Li X., Yu F., Guo A. Sleep deprivation specifically impairs short-term olfactory memory in *Drosophila*. *Sleep*, 2009b, 32, p. 1417-1424
- Liu X., Buchanan M. E., Han K. A., Davis R. L. The GABAA receptor RDL suppresses the conditioned stimulus pathway for olfactory learning. *J Neurosci*, 2009, 29, p. 1573-1579
- Liu X., Davis R. L. The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nat Neurosci*, 2009, 12, p. 53-59
- Liu X., Krause W. C., Davis R. L. GABAA receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron*, 2007, 56, p. 1090-1102
- Livingstone M. S., Sziber P. P., Quinn W. G. Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylyl cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell*, 1984, 37, p. 205-215

- Lu Y., Lu Y. S., Shuai Y., Feng C., Tully T., Xie Z., Zhong Y., *et al.* The AKAP Yu is required for olfactory long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, p. 13792-13797
- Lyons L. C., Rawashdeh O., Katzoff A., Susswein A. J., Eskin A. Circadian modulation of complex learning in diurnal and nocturnal *Aplysia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102, p. 12589-12594
- Lyons L. C., Roman G. Circadian modulation of short-term memory in *Drosophila*. *Learning & memory*, 2009, 16, p. 19-27
- Mackiewicz M., Shockley K. R., Romer M. A., Galante R. J., Zimmerman J. E., Naidoo N., Baldwin D. A., *et al.* Macromolecule biosynthesis: a key function of sleep. *Physiological genomics*, 2007, 31, p. 441-457
- Mank M., Reiff D. F., Heim N., Friedrich M. W., Borst A., Griesbeck O. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J*, 2006, 90, p. 1790-1796
- Manoli D. S., Foss M., Vилlella A., Taylor B. J., Hall J. C., Baker B. S. Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature*, 2005, 436, p. 395-400
- Mao Z., Roman G., Zong L., Davis R. L. Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, p. 198-203
- McBride S. M., Giuliani G., Choi C., Krause P., Correale D., Watson K., Baker G., *et al.* Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 1999, 24, p. 967-977
- McClelland J. L., McNaughton B. L., O'Reilly R. C. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological review*, 1995, 102, p. 419-457
- McDermott C. M., LaHoste G. J., Chen C., Musto A., Bazan N. G., Magee J. C. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2003, 23, p. 9687-9695
- McGuire S. E., Le P. T., Osborn A. J., Matsumoto K., Davis R. L. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science*, 2003, 302, p. 1765-1768
- Mery F., Kawecki T. J. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science*, 2005, 308, p. 1148
- Miesenbock G., De Angelis D. A., Rothman J. E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 1998, 394, p. 192-195
- Mistlberger R. E., de Groot M. H., Bossert J. M., Marchant E. G. Discrimination of circadian phase in intact and suprachiasmatic nuclei-ablated rats. *Brain research*, 1996, 739, p. 12-18
- Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R., Tsien R. Y. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96, p. 2135-2140
- Monk T. H., Folkard S. Concealed inefficiency of late-night study. *Nature*, 1978, 273, p. 296-297
- Nagel G., Brauner M., Liewald J. F., Adeishvili N., Bamberg E., Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current biology : CB*, 2005, 15, p. 2279-2284

- Nakai J., Ohkura M., Imoto K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 2001, 19, p. 137-141
- Nguyen P. V., Woo N. H. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Progress in neurobiology*, 2003, 71, p. 401-437
- Nighorn A., Healy M. J., Davis R. L. The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron*, 1991, 6, p. 455-467
- Nitz D. A., van Swinderen B., Tononi G., Greenspan R. J. Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Current biology : CB*, 2002, 12, p. 1934-1940
- Palchykova S., Crestani F., Meerlo P., Tobler I. Sleep deprivation and daily torpor impair object recognition in Djungarian hamsters. *Physiology & behavior*, 2006a, 87, p. 144-153
- Palchykova S., Winsky-Sommerer R., Meerlo P., Durr R., Tobler I. Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2006b, 85, p. 263-271
- Pan L., Broadie K. S. *Drosophila fragile X* mental retardation protein and metabotropic glutamate receptor A convergently regulate the synaptic ratio of ionotropic glutamate receptor subclasses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2007, 27, p. 12378-12389
- Pan L., Zhang Y. Q., Woodruff E., Broadie K. The *Drosophila fragile X* gene negatively regulates neuronal elaboration and synaptic differentiation. *Curr Biol*, 2004, 14, p. 1863-1870
- Parisky K. M., Agosto J., Pulver S. R., Shang Y., Kuklin E., Hodge J. J., Kang K., *et al.* PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron*, 2008, 60, p. 672-682
- Pascual A., Huang K. L., Neveu J., Preat T. Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory. *Nature*, 2004, 427, p. 605-606
- Pascual A., Preat T. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science*, 2001, 294, p. 1115-1117
- Pavlopoulos E., Anezaki M., Skoulakis E. M. Neuralized is expressed in the alpha/beta lobes of adult *Drosophila* mushroom bodies and facilitates olfactory long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, p. 14674-14679
- Perazzona B., Isabel G., Preat T., Davis R. L. The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24, p. 8823-8828
- Pitman J. L., McGill J. J., Keegan K. P., Allada R. A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature*, 2006, 441, p. 753-756
- Placais P. Y., Trannoy S., Isabel G., Aso Y., Siwanowicz I., Belliard-Guerin G., Vernier P., *et al.* Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nature neuroscience*, 2012,
- Plihal W., Born J. Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory. *Psychophysiology*, 1999, 36, p. 571-582
- Preat T. Decreased odor avoidance after electric shock in *Drosophila* mutants biases learning and memory tests. *J Neurosci*, 1998, 18, p. 8534-8538
- Presente A., Boyles R. S., Serway C. N., de Belle J. S., Andres A. J. Notch is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, p. 1764-1768
- Qin H., Cressy M., Li W., Coravos J. S., Izzì S. A., Dubnau J. Gamma Neurons Mediate Dopaminergic Input during Aversive Olfactory Memory Formation in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 2012,

- Qiu Y., Davis R. L. Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, 1993, 7, p. 1447-1458
- Quinn W. G., Harris W. A., Benzer S. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974, 71, p. 708-712
- Quinn W. G., Sziber P. P., Booker R. The *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Nature*, 1979, 277, p. 212-214
- Rattenborg N. C., Martinez-Gonzalez D., Roth T. C., 2nd, Pravosudov V. V. Hippocampal memory consolidation during sleep: a comparison of mammals and birds. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2011, 86, p. 658-691
- Rauchs G., Feyers D., Landeau B., Bastin C., Luxen A., Maquet P., Collette F. Sleep contributes to the strengthening of some memories over others, depending on hippocampal activity at learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011, 31, p. 2563-2568
- Rawashdeh O., de Borsetti N. H., Roman G., Cahill G. M. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science*, 2007, 318, p. 1144-1146
- Restivo L., Ferrari F., Passino E., Sgobio C., Bock J., Oostra B. A., Bagni C., *et al.* Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102, p. 11557-11562
- Riemensperger T., Voller T., Stock P., Buchner E., Fiala A. Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2005, 15, p. 1953-1960
- Roman G., Endo K., Zong L., Davis R. L. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98, p. 12602-12607
- Rubin G. M., Hong L., Brokstein P., Evans-Holm M., Frise E., Stapleton M., Harvey D. A. A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science*, 2000, 287, p. 2222-2224
- Ruskin D. N., Liu C., Dunn K. E., Bazan N. G., LaHoste G. J. Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. *The European journal of neuroscience*, 2004, 19, p. 3121-3124
- Sakai T., Tamura T., Kitamoto T., Kidokoro Y. A clock gene, *period*, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101, p. 16058-16063
- Sanes J. R., Lichtman J. W. Can molecules explain long-term potentiation? *Nature neuroscience*, 1999, 2, p. 597-604
- Schenck A., Van de Bor V., Bardoni B., Giangrande A. Novel features of *dFMR1*, the *Drosophila* orthologue of the fragile X mental retardation protein. *Neurobiol Dis*, 2002, 11, p. 53-63
- Schmucker D., Chen B. *Dscam* and *DSCAM*: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes & development*, 2009, 23, p. 147-156
- Schmucker D., Clemens J. C., Shu H., Worby C. A., Xiao J., Muda M., Dixon J. E., *et al.* *Drosophila Dscam* is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 2000, 101, p. 671-684
- Schwaerzel M., Heisenberg M., Zars T. Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron*, 2002, 35, p. 951-960
- 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, p. 10495-10502
- Séjourné J., Plaçais P.Y., Aso Y., Siwanowicz I., Trannoy S., Thoma V., Tedjakumala S.R., *et al.* Mushroom Body Efferent Neurons Responsible For Aversive Olfactory Memory Retrieval In *Drosophila*. *Nat Neurosci*, 2011,

- Seugnet L., Suzuki Y., Vine L., Gottschalk L., Shaw P. J. D1 receptor activation in the mushroom bodies rescues sleep-loss-induced learning impairments in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 2008, 18, p. 1110-1117
- Shafer O. T., Helfrich-Forster C., Renn S. C., Taghert P. H. Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *The Journal of comparative neurology*, 2006, 498, p. 180-193
- Shaw P. J., Cirelli C., Greenspan R. J., Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000, 287, p. 1834-1837
- Shaw P. J., Franken P. Perchance to dream: solving the mystery of sleep through genetic analysis. *Journal of neurobiology*, 2003, 54, p. 179-202
- Shaw P. J., Tononi G., Greenspan R. J., Robinson D. F. Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila*. *Nature*, 2002, 417, p. 287-291
- Shuai Y., Lu B., Hu Y., Wang L., Sun K., Zhong Y. Forgetting is regulated through Rac activity in *Drosophila*. *Cell*, 2010, 140, p. 579-589
- Sitaraman D., Zars M., Laferriere H., Chen Y. C., Sable-Smith A., Kitamoto T., Rottinghaus G. E., *et al.* Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, p. 5579-5584
- Skoulakis E. M., Davis R. L. Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a *Drosophila* gene encoding a 14-3-3 protein. *Neuron*, 1996, 17, p. 931-944
- Skoulakis E. M., Kalderon D., Davis R. L. Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron*, 1993, 11, p. 197-208
- Smith C., Rose G. M. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiology & behavior*, 1996, 59, p. 93-97
- Smith C., Rose G. M. Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. *Behavioral neuroscience*, 1997, 111, p. 1197-1204
- Stocker R. F., Lienhard M. C., Borst A., Fischbach K. F. Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell and tissue research*, 1990, 262, p. 9-34
- Stockinger P., Kvitsiani D., Rotkopf S., Tirian L., Dickson B. J. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell*, 2005, 121, p. 795-807
- Stoleru D., Peng Y., Agosto J., Rosbash M. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 2004, 431, p. 862-868
- Strausfeld N. J., Hansen L., Li Y., Gomez R. S., Ito K. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learning & memory*, 1998, 5, p. 11-37
- Struhl G., Adachi A. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell*, 1998, 93, p. 649-660
- Sweeney S. T., Broadie K., Keane J., Niemann H., O'Kane C. J. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron*, 1995, 14, p. 341-351
- T M., Hari Dass S., Sharma V. K. Egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Journal of genetics*, 2008, 87, p. 495-504
- Takahashi J. S., Hong H. K., Ko C. H., McDearmon E. L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature reviews. Genetics*, 2008, 9, p. 764-775
- Tang S., Guo A. Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science*, 2001, 294, p. 1543-1547
- Thorne N., Chromey C., Bray S., Amrein H. Taste perception and coding in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 2004, 14, p. 1065-1079
- Tian L., Hires S. A., Mao T., Huber D., Chiappe M. E., Chalasani S. H., Petreanu L., *et al.* Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods*, 2009, 6, p. 875-881

- Tononi G., Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep medicine reviews*, 2006, 10, p. 49-62
- Tully T., Preat T., Boynton S. C., Del Vecchio M. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*, 1994, 79, p. 35-47
- Tully T., Quinn W. G. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 1985, 157, p. 263-277
- Valentinuzzi V. S., Buxton O. M., Chang A. M., Scarbrough K., Ferrari E. A., Takahashi J. S., Turek F. W. Locomotor response to an open field during C57BL/6J active and inactive phases: differences dependent on conditions of illumination. *Physiology & behavior*, 2000, 69, p. 269-275
- Valentinuzzi V. S., Menna-Barreto L., Xavier G. F. Effect of circadian phase on performance of rats in the Morris water maze task. *Journal of biological rhythms*, 2004, 19, p. 312-324
- van Swinderen B., Nitz D. A., Greenspan R. J. Uncoupling of brain activity from movement defines arousal States in *Drosophila*. *Current biology : CB*, 2004, 14, p. 81-87
- Vecsey C. G., Baillie G. S., Jaganath D., Havekes R., Daniels A., Wimmer M., Huang T., *et al.* Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. *Nature*, 2009, 461, p. 1122-1125
- Waddell S., Quinn W. G. What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends Genet*, 2001, 17, p. 719-726
- Wagh D. A., Rasse T. M., Asan E., Hofbauer A., Schwenkert I., Durrbeck H., Buchner S., *et al.* Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*, 2006, 49, p. 833-844
- Walker M. P., Stickgold R. Sleep, memory, and plasticity. *Annual review of psychology*, 2006, 57, p. 139-166
- Wang J., Ma X., Yang J. S., Zheng X., Zugates C. T., Lee C. H., Lee T. Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent Dscam distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron*, 2004a, 43, p. 663-672
- Wang Y., Chiang A. S., Xia S., Kitamoto T., Tully T., Zhong Y. Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Curr Biol*, 2003, 13, p. 1900-1904
- Wang Y., Mamiya A., Chiang A. S., Zhong Y. Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci*, 2008, 28, p. 4368-4376
- Wang Z., Singhvi A., Kong P., Scott K. Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell*, 2004b, 117, p. 981-991
- Whitworth A. J. *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Advances in genetics*, 2011, 73, p. 1-50
- Wolf R., Wittig T., Liu L., Wustmann G., Eyding D., Heisenberg M. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learning & memory*, 1998, 5, p. 166-178
- Wright N. J. An in vivo technique for pharmacological manipulation of *Drosophila* brain during optical recording. *J Neurosci Methods*, 2006, 155, p. 77-80
- Wu C. L., Shih M. F., Lai J. S., Yang H. T., Turner G. C., Chen L., Chiang A. S. Heterotypic Gap Junctions between Two Neurons in the *Drosophila* Brain Are Critical for Memory. *Current biology : CB*, 2011, 21, p. 848-854
- Yao W. D., Wu C. F. Distinct roles of CaMKII and PKA in regulation of firing patterns and K(+) currents in *Drosophila* neurons. *J Neurophysiol*, 2001, 85, p. 1384-1394

- Yin J. C., Del Vecchio M., Zhou H., Tully T. CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 1995, 81, p. 107-115
- Yin J. C., Wallach J. S., Del Vecchio M., Wilder E. L., Zhou H., Quinn W. G., Tully T. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 1994, 79, p. 49-58
- Yoo S. S., Hu P. T., Gujar N., Jolesz F. A., Walker M. P. A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nature neuroscience*, 2007, 10, p. 385-392
- Yu D., Akalal D. B., Davis R. L. *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron*, 2006, 52, p. 845-855
- Yu D., Keene A. C., Srivatsan A., Waddell S., Davis R. L. *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell*, 2005, 123, p. 945-957
- Yu D., Ponomarev A., Davis R. L. Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning; memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron*, 2004, 42, p. 437-449
- Yuan Q., Joiner W. J., Sehgal A. A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Curr Biol*, 2006, 16, p. 1051-1062
- Yuan Q., Lin F., Zheng X., Sehgal A. Serotonin modulates circadian entrainment in *Drosophila*. *Neuron*, 2005, 47, p. 115-127
- Zars T., Fischer M., Schulz R., Heisenberg M. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science*, 2000, 288, p. 672-675
- Zhang J., Ma Y., Taylor S. S., Tsien R. Y. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98, p. 14997-15002
- Zhang K., Guo J. Z., Peng Y., Xi W., Guo A. Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science*, 2007, 316, p. 1901-1904
- Zhang Y., Liu Y., Bilodeau-Wentworth D., Hardin P. E., Emery P. Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Current biology : CB*, 2010, 20, p. 600-605
- Zhou X., Yuan C., Guo A. *Drosophila* olfactory response rhythms require clock genes but not pigment dispersing factor or lateral neurons. *Journal of biological rhythms*, 2005, 20, p. 237-244
- Zimmerman J. E., Naidoo N., Raizen D. M., Pack A. I. Conservation of sleep: insights from non-mammalian model systems. *Trends Neurosci*, 2008, 31, p. 371-376
- Zimmerman J. E., Rizzo W., Shockley K. R., Raizen D. M., Naidoo N., Mackiewicz M., Churchill G. A., *et al.* Multiple mechanisms limit the duration of wakefulness in *Drosophila* brain. *Physiological genomics*, 2006, 27, p. 337-350