



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
PREPAREE A

**Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation**

AgroSup Dijon, CNRS, INRAe, Université Bourgogne Franche-Comté

Ecole doctorale n° 554 **Environnement - Santé**

Doctorat de **Neurosciences**

Par

**Vincent TOLASSY**

Effets d'une exposition précoce combinée  
Entre phéromone et nourriture sur le développement  
Comportemental des adultes *Drosophila melanogaster*

Thèse présentée et soutenue à **Dijon**, le **19 janvier 2023**

Composition du Jury :

M NEIERS Fabrice

Mme D'ETTORRE Patrizia

M BILLETER Jean-Christophe

Mme ANTON Sylvia

Mme JACQUIN-JOLY Emmanuelle

M FERVEUR Jean-François

M EVERAERTS Claude

Pr. CSGA, Université de Bourgogne

Pr. Membre senior, Sorbonne Paris Nord

Pr. Université de Groningen

DR. Membre senior, IGEPP Angers

DR., INRAe IEES Paris

DR. CNRS, Université de Bourgogne

CR. CNRS, Université de Bourgogne

**Président**

**Rapporteuse**

**Rapporteur**

**Examinatrice**

**Examinatrice**

**Invité**

**Directeur de thèse**

## Effets d'une exposition précoce combinée entre phéromone et nourriture Sur le développement comportemental des adultes *Drosophila melanogaster*

**Mots clés :** *Drosophila*, imprégnation, phéromones, cVA, tunnel de vol, électroantennographie

Chez *Drosophila melanogaster*, la communication phéromonale se fait majoritairement au moyen des hydrocarbures cuticulaires sexuellement spécifiques (et de produits dérivés) et du 11 - *cis* - vaccényle acétate (cVA), phéromone lipidique mâle. Leur dépôt conjoint sur la nourriture, véritable signature chimique de l'espèce, attire mâles et femelles conspécifiques et favorise accouplements et comportements collectifs. Initialement décrite comme stéréotypée, il a récemment été montré que la réponse adulte aux phéromones pouvait cependant être plastique et dépendre notamment de l'expérience juvénile d'un individu (i.e. imprégnation). Dans ce contexte, le phénomène d'empreinte au cVA a fait l'objet d'une analyse à travers l'étude du rôle agrégatif de la phéromone chez des individus dont l'imprégnation a été manipulée.

La première échelle, comportementale, avait pour but d'étudier l'attraction à distance de mâles et femelles imprégnés ou non au cVA vers un choix de nourritures marquées au moyen d'un tunnel de vol. Le marquage était soit réalisé naturellement par les dépôts phéromonaux et microbiotiques de conspécifiques, soit manuellement par dépôt de cVA synthétique. Cette première expérience a fait l'objet d'une analyse complémentaire des espaces de tête des nourritures utilisées visant à étudier la nature et l'origine des odorants émis. Les résultats ont mis en évidence la nécessité d'un contact larvaire avec le cVA dans la modulation de l'attraction adulte à la phéromone, cependant l'exposition synthétique au cVA seul ne suffit pas à rétablir pleinement l'attraction naturelle, supposant que d'autres composés sont impliqués dans l'imprégnation. L'attractivité des nourritures apparaît de plus dépendante du sexe de la *Drosophila* testée, de la nature du marquage présent sur la nourriture et du choix de nourritures proposées.

La deuxième échelle, électrophysiologique, avait pour but d'étudier la réponse antennaire de mâles et femelles imprégnés ou non au cVA lors de la diffusion à courte distance de la phéromone. Les enregistrements ont mis en évidence l'existence de différences de réponses périphériques selon l'exposition pré-imaginale à la phéromone, mais pas selon le sexe. Il semble donc que les différences de comportements observables entre mâles et femelles en tunnel de vol s'expliquent par le dimorphisme central de circuiterie du cVA plutôt que par une détection périphérique différente de la phéromone. Finalement, l'absence de différence de réponses entre les individus non - imprégnés et synthétiquement imprégnés soutient davantage la nécessité de contact avec d'autres composés en plus du cVA pendant la période larvaire afin de permettre l'imprégnation totale à la phéromone.

---

## Effects of early combined pheromone and food exposure on the behavioral development of adult *Drosophila melanogaster*

**Keywords:** *Drosophila*, imprinting, pheromones, cVA, flight tunnel, electroantennography

In *Drosophila melanogaster*, pheromonal communication is mainly mediated through sex-specific cuticular hydrocarbons (and derived compounds) and the male lipidic pheromone 11 - *cis* - Vaccényle Acétate (cVA). When deposited together on the feeding substrate they attract conspecifics males and females, promoting mating and collective behaviors. Initially described as stereotyped, recent findings showed that adult response to pheromones could be plastic and depend on the juvenile experience of an individual (i.e. imprinting). In this context, we studied cVA imprinting through its aggregative effect in individuals whose imprinting has been manipulated.

The first goal, behavioral, was to study long-range attraction of cVA (or not)-imprinted males and females presented with a dual food choice in a flight tunnel. Foods were either naturally labelled by conspecifics (depositing their pheromonal and microbial compounds) or manually enriched with cVA. This first experiment was completed by the analysis of labeled food headspaces to decipher sources and natures of volatiles odorant compounds attracting *Drosophila*. This experiment highlighted the necessity of an early larval contact with cVA to modulate adult attraction to the pheromone. However, manual larval exposure to cVA alone was not sufficient to fully restore adult attraction, which may indicate that other compounds are needed in the pheromone imprinting. Food choice finally appeared to be a sex-specific behavior dependent on the nature of the food labelling and the dual food choice presented.

The second goal was to study the electrophysiological antennal response of cVA (or not)-imprinted males and females when presented with a short-range puff of the pheromone. Recording showed modulation of the peripheral response according to pre-imaginal exposure to cVA but not the sex. It seems that sex-specific long-range attraction in the flight tunnel is rather explained by the central dimorphism of cVA-neural olfactory system than by a different peripheral detection of the pheromone. Finally, the similarity of peripheral response in unimprinted and manually imprinted individuals to cVA alone support the hypothesis that larval imprinting to cVA needs additional parental compounds to be fully effective in adult.





# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce modeste travail, Patrizia D'Ettoire et Jean-Christophe Billeter pour avoir accepté d'être rapporteurs et Sylvia Anton, Emmanuelle Jacquin-Joly et Fabrice Neiers pour avoir accepté d'examiner cette thèse. Une pensée particulière à Fabrice et Emmanuelle pour votre écoute, votre bienveillance et vos encouragements pendant mes comités.

Merci à Claude et Jean-François pour m'avoir sélectionné sur ce sujet, leur aide précieuse et constante pendant ces 3 années. Ce projet est autant le mien que le vôtre et vous avez été indispensables à son aboutissement et à sa valorisation.

Merci à ma famille pour les dramas dignes des meilleures télénovelas. A ma mère et à Laurent pour leurs encouragements et soutien infailible, à ma tante pour m'avoir appris à observer la nature et à mes grands-parents pour leur amour inconditionnel et éternel.

Merci à mes anciens amis Clarinette, Poupoule, Paupaule, Juju et Nigga pour m'avoir soutenu (mais surtout supporté) ces trois dernières années. Merci à mes nouveaux amis dijonnais (au moins de cœur) Rico, Caro, Minouille, Didi, Toto, Mathieu, Philippe et Nigga (encore toi ?!). Cette thèse aurait été rapidement écourtée sans votre présence au quotidien.

Merci aux deux soleils avec qui j'ai la chance de vivre, Marie et Manon, pour cette coloc' d'exception, votre écoute et votre amour. Vous rendez la limite entre amis et famille floue <3

Merci à l'équipe 2 pour son accueil, et particulièrement à Elodie et Stéphane Dupas (le grand Stéphane) pour leur bonne humeur, leurs conseils et les discussions passionnées de sport et d'écologie. Merci à Laurie Cazalé-Debat et Julien Thibert pour leur conseil et écoute en début de thèse.

Merci à David Jarriault pour son aide en électrophysiologie et à Jean-Marie Heydel et Rémy Reynaud pour leur complicité et leur aide en headspace.

Merci aux Drosophiles pour avoir fait de moi « l'homme qui faisait voler les mouches ». Promis les mauvais traitements sont finis !

Et enfin, Merci à toute personne dont j'ai croisé la route pendant ces 3 années et qui ont participé, de près ou de loin, à la personne que je suis aujourd'hui.

**ELODIE**



**VINCENT**



**NICOLAS**



**Le Bureau des  
Légendes**



# SOMMAIRE

Listes	1
<b>Abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Figures et Tableaux</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>5</b>
<b>I - La communication chimique</b>	<b>6</b>
Valeurs adaptatives et coûts	6
Classification des sémiachimiques	7
Pheromones dans l'environnement juvénile chez les Mammifères	8
<b>II - Imprégnation dans le monde animal</b>	<b>11</b>
Découverte du phénomène	11
Généralisation de l'imprégnation	11
<b>III - Système olfactif des Insectes</b>	<b>13</b>
Classification morphologique, spatiale et fonctionnelle des sensilles	13
Fonctionnement des sensilles et récepteurs	16
Glomérules et spatialisation de la réponse cérébrale	17
Les centres supérieurs d'intégration olfactive	18
Mémoires olfactives	19
<b>IV - <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>22</b>
Origines et mode de vie du modèle d'étude	22
Pheromones de la Drosophile	23
Les hydrocarbures cuticulaires (HC)	24
Le cis – Vaccényl Acétate (cVA)	26
<b>V - Orientation et choix de nourritures en vol</b>	<b>28</b>
Le vol chez la Drosophile	28
Etude du vol en laboratoire	28
Agrégation chez la Drosophile	29
Attraction au cVA	30
Choix de nourritures	31
<b>VI - Plasticité du système nerveux olfactif central chez la Drosophile</b>	<b>32</b>
Cycle de vie de la Drosophile	32
Les périodes critiques	33
Le Conditionnement pré-imaginal	34
<b>VII - But de la thèse</b>	<b>37</b>

<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>40</b>
<b>Elevages et prélèvement des individus</b>	<b>41</b>
<b>Traitements pré-imaginaux et imprégnation au cVA</b>	<b>43</b>
<b>Tunnel de vol</b>	<b>45</b>
Marquages des nourritures	47
<b>Analyses chimiques des composés volatils émis par les nourritures marquées</b>	<b>50</b>
<b>Electroantennographie (EAG)</b>	<b>53</b>
<b>Analyses statistiques</b>	<b>56</b>
<b>Résultats</b>	<b>57</b>
<b>Tunnel de vol</b>	<b>58</b>
Fréquences d'envol	59
Fréquences d'atterrissage	59
Choix de nourriture	60
Latences d'envol	62
Temps mis pour atteindre une nourriture	64
<b>Analyses chimiques des odeurs de Drosophiles et des milieux marqués</b>	<b>69</b>
<b>Electroantennographie</b>	<b>73</b>
Dépolarisations	74
Repolarisations	74
Corrélations dépolarisations et repolarisations	76
<b>Discussion</b>	<b>80</b>
<b>I – Composés odorants de nourritures marquées par des Drosophiles</b>	<b>82</b>
Principales sources odorantes	82
Attractivité des nourritures marquées	83
Sources de variabilité en tunnel de vol	85
<b>II - Facteurs modulant l'attraction au cVA</b>	<b>86</b>
Dimorphisme sexuel d'attraction au cVA	86
Imprégnations et pertinences écologiques	87
Limites de l'imprégnation synthétique au cVA	89
<b>III - Détection et intégration du cVA</b>	<b>90</b>
Réception périphérique du cVA	90
Dimorphisme sexuel de réception du cVA	91
Dimorphisme sexuel d'intégration centrale du cVA	91
Plasticité de la réponse périphérique à un odorant	93
Distribution naturelle vs. synthétique du cVA	95



<b>IV – Imprégnation au cVA</b>	<b>98</b>
Circuiterie neuronale olfactive chez la larve	98
Hypothèses de réception du cVA chez la larve	99
Développement du SNC olfactif adulte	103
<b>V - Limites des traitements pré-imaginaux</b>	<b>105</b>
Dégradation du cVA	105
Composition et transmission du fluide séminale	105
Protéines des glandes accessoires	107
Qualité du sperme	108
<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>113</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>117</b>
<b>Annexes</b>	<b>152</b>
<b>Figures complémentaires</b>	<b>153</b>
<b>Publications et Communications</b>	<b>159</b>



# LISTES

## Abréviations

### Protéines

- ACP : Protéines des glandes accessoires (*Accessory Gland Protein*),
- CSP : Protéines chimiosensibles (*Chemosensory Protein*),
- Dup99B : Ductus ejaculatorius peptide 99B,
- Est-6 : Estérase-6,
- GOBP : Protéines générales de ligation d'odorants (*General Odorant Binding Protein*),
- OBP : Protéines de ligation d'odorants (*Odorant Binding Protein*),
- PBP : Protéines de ligation de phéromones (*Pheromone Binding Protein*),
- SNMP : Protéines de membrane de neurone sensoriel (*Sensory Neuron Membrane Protein*),
- SP : Peptide sexuel (*Sex-Peptide*),

### Composés chimiques et phéromonaux

- 2MB2 : 2-méthylbut-2-ène,
- 7,11-HD : 7,11-heptacosadiène,
- 7,11-ND : 7,11-nonacosadiène,
- 7-P : 7-pentacosène,
- 7-T : 7-tricosène,
- 9-P : 9-pentacosène,
- 9-T : 9-tricosène,
- 11-P : 11-pentacosène,
- cVA : (Z) – 11 – octadécène – 1 – yl ou *cis* – Vaccényl Acétate,
- cVOH : *cis*-Vaccénol,
- HC : Hydrocarbures cuticulaires (*Cuticular Hydrocarbons*),
- JH : Hormone juvénile (*Juvenile Hormone*),
- VOC : Composés organiques volatiles (*Volatile Organics Compounds*),
- Z4-11Al : (Z)-4-undécénal,

### **Processus mnésiques et neuronaux**

- ITM : Mémoire à moyen terme ou intermédiaire (*Intermediate-Term Memory*),
- LP-LTM : Mémoire à long terme tardive (*Late Phase Long-Term Memory*),
- LTCA : Adaptation centrale à long terme (*Long-Term Central Adaptation*),
- LTH : Habituation olfactive à long terme (*Long-Term Habituation*),
- LTM : Mémoire à long terme (*Long-Term Memory*),
- STM : Mémoire à court terme (*Short-Term Memory*),

### **Eléments Neuroanatomiques**

- APL : Neurones GABAergiques antérieurs latéraux appariés (*Anterior Paired Lateral Neuron*),
- GRN : Neurones gustatifs (*Gustatory Receptor Neuron*),
- iACT : Tractus antenno-cérébraux internes (*Inner Antenno-Cerebral Tract*),
- Ir : Récepteurs ionotropiques (*Ionotropic Receptor*),
- KC : Cellules de Kenyon (*Kenyon Cell*),
- LAL : Lobes antennaires larvaires (*Larval Antennal Lobe*),
- LH : Corne latérale (*Lateral Horn*),
- mACT : Tractus antenno-cérébraux médians (*Medial Antenno-Cerebral Tract*),
- MB : Lobes pédonculés (*Mushroom Bodies*),
- mPN : Neurones de projection multi-glomérulaires (*Multiglomerular Projection Neuron*),
- Or : Récepteurs odorants (*Olfactory receptor*),
- Orco : Corécepteur olfactif (*Olfactory Co-receptor*),
- ORN : Neurones olfactifs (*Olfactory Receptor Neuron*),
- PN : Neurones de projection (*Projection Neuron*),
- Pr : Récepteurs phéromonaux (*Pheromone Receptor*),
- uPN : Neurones de projection uni-glomérulaire (*Uniglomerular Projection Neuron*),

### **Techniques expérimentales et analyses statistiques**

- ACP : Analyse en Composantes Principales,
- AFD : Analyse Factorielle Discriminante,
- EAG : Electroantennographie,

## Figures et Tableaux

<b>Figure 1</b> – Classification des molécules sémiochimiques .....	7
<b>Figure 2</b> – Schématisation du système olfactif périphérique antennaire de <i>D. melanogaster</i> .....	15
<b>Figure 3</b> – Schématisation du Système Nerveux olfactif central de <i>D. melanogaster</i> adulte.	19
<b>Figure 4</b> – Modèle de formation des traces mnésiques après un conditionnement olfactif classique (adapté de Davis, 2011) .....	21
<b>Figure 5</b> - Modalités d'échanges des signaux phéromonaux olfactifs chez <i>D. melanogaster</i> et comportements qui en découlent chez les deux sexes (adapté de Auer & Benton, 2016). .....	23
<b>Figure 6</b> – Illustration de l'effet pléiotrope du cVA dans les populations naturelles de <i>D. melanogaster</i> (adapté de Ejima, 2015) .....	27
<b>Figure 7</b> – Cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
<b>Figure 8</b> - Principaux caractères dimorphiques chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	42
<b>Figure 9</b> - Protocole permettant l'obtention de descendants issus des 4 traitements pré-imaginaux CS, J1, J5 et J5 + cVA .....	44
<b>Figure 10</b> – Dispositif de tunnel de vol .....	47
<b>Figure 11</b> - Processus d'obtention des nourritures marquées par des Drosophiles ou du témoin vierge utilisées lors des tests de choix en tunnel de vol.....	49
<b>Figure 12</b> - Dispositif d'analyse d'espace de tête des nourritures marquées .....	52
<b>Figure 13</b> – Dispositif d'électroantennographie sur <i>D. melanogaster</i> . .....	55
<b>Figure 14</b> – Pourcentages d'envols, d'atterrissages et de choix de nourritures marquées des femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> observés en tunnel de vol .....	58
<b>Figure 15</b> – Latences d'envol des femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> testées en tunnel de vol .....	62
<b>Figure 16</b> – Temps mis par les femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> testés en tunnel de vol pour atterrir sur une nourriture après leur envol.....	64
<b>Figure 17</b> – Analyses en Composantes Principales sur données mixtes et corrélations des variables de tunnel de vol .....	66
<b>Figure 18</b> - Analyses en composantes principales par Bootstrap des principaux odorants issus de la présence des Drosophiles et des nourritures marquées utilisées en tunnel de vol.....	71
<b>Figure 19</b> – Amplitudes de dépolarisation et vitesses de repolarisation des antennes de femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> obtenues par enregistrements électrophysiologiques .....	73
<b>Figure 20</b> – Corrélations des vitesses de repolarisations et des amplitudes de dépolarisations des antennes de femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> obtenues par enregistrements électrophysiologiques.....	76

<b>Figure 21</b> – Analyses factorielles discriminantes des variables pertinentes mesurées par électroantennographie sur femelles et mâles <i>D. melanogaster</i> CS, J1, J5 et J5 + cVA..	79
<b>Figure 22</b> – Modèle de détection du cVA par les récepteurs 67d (adapté de Sengupta & Smith, 2014) .....	91
<b>Figure 23</b> – Représentation schématique des sources de cVA, responsables de la micro-distribution de la phéromone dans l’environnement naturel des larves de 1 <sup>er</sup> stade de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	96
<b>Figure 24</b> – Etapes hypothétiques d’intégration de neurones gustatifs larvaires dans le système nerveux central olfactif adulte chez <i>D. melanogaster</i> .....	102
<b>Figure 25</b> – Différences principales de l’environnement intra-utérin de femelles accouplées le jour même de la ponte ou 5 jours avant. ....	109
<b>Tableau 1</b> Récapitulatifs des prédictions et résultats obtenus pour les différents choix de nourriture en tunnel de vol. Voir Matériels et Méthodes pour signification des nourritures utilisées et mouches testées en vol. ....	38
<b>Tableau 2</b> Effectifs de <i>Drosophiles melanogaster</i> issus des 4 traitements pré-imaginaux et testés en tunnel de vol face aux choix de nourritures (marquées ou non) indiqués en première colonne .....	49
<b>Tableau 3</b> Programme d’étirement des capillaires en verre nécessaires aux enregistrements électrophysiologiques antennaires sur <i>Drosophiles</i> . Le même programme est utilisé pour l’obtention des capillaires de référence et d’enregistrement. ....	53
<b>Tableau 4 [Annexe]</b> Résultats des tests de Wilcoxon pour échantillons appariés sur les données de dépolarisations et repolarisations entre les réponses initiales et finales au 1-hexanol .....	153
<b>Tableau 5 [Annexe]</b> Résultats des analyses des espaces de tête d’environnements avec ou sans nourritures manipulés par des <i>Drosophiles</i> et en présence ou non de cVA .....	154







**INTRODUCTION**



## I - La communication chimique

Décrite par **Wilson (1975)** dans son livre *Sociobiology : The New Synthesis*, la communication chimique est considérée comme le canal ancestral de communication. Elle est partagée par tous les êtres vivants uni- et pluricellulaires et se caractérise par l'émission et la détection de molécules plus ou moins volatiles.

Elle implique deux modalités sensorielles :

- La modalité gustative qui permet la réception de composés chimiques non volatiles et s'inscrit dans les interactions rapprochées. Elle trouve sa place dans toutes situations spatialement restreintes où les contacts avec la source odorante sont les plus fréquents (grégarisme, choix de partenaire sexuel et initiation de parade, évitement d'aliments toxiques).
- La modalité olfactive qui se caractérise par la détection de composés volatiles à distance et dilués dans un fluide (air ou eau). Elle favorise notamment la recherche d'habitats, de nourritures et le regroupement de partenaires en même temps que l'évitement de prédateurs, ennemis et conditions délétères (**Wyatt, 2003**).

### Valeurs adaptatives et coûts

La modalité olfactive (diffusion et réception de molécules à distance) présente plusieurs avantages sur les autres modes de communication. Elle est en effet particulièrement intéressante dans les situations où (i) les informations auditives et visuelles sont limitées et où (ii) les individus émetteurs et récepteurs sont physiquement éloignés. Elle permet par exemple à des partenaires sexuels de s'orienter efficacement et de se rencontrer (**Wyatt, 2003**) ou à une proie d'éviter habilement ses ennemis (**Kannan et al., 2022**). Un autre avantage réside dans le faible coût énergétique de production des messages odorants car ils dérivent de déchets métaboliques et hormonaux excrétés dans l'environnement et sont initialement dépourvus de fonctions communicatives (**Sørensen & Scott, 1994 ; Wyatt, 2010**).

Les coûts associés à la communication chimique proviendraient donc majoritairement des coûts énergétiques directs liés au signalement (**Blows, 2002 ; Johansson et al., 2005**) et des coûts sociaux indirects liés à l'attraction possible de compétiteurs ou parasites (**Gosling & Roberts, 2001 ; Johansson & Jones, 2007**).

## Classification des sémiochimiques

Une terminologie classant les molécules favorisées par Sélection Naturelle et impliquées en communication chimique est proposée par **Law & Regnier (1971)** puis **Wehrenfennig et al., (2013) (Figure 1)**.

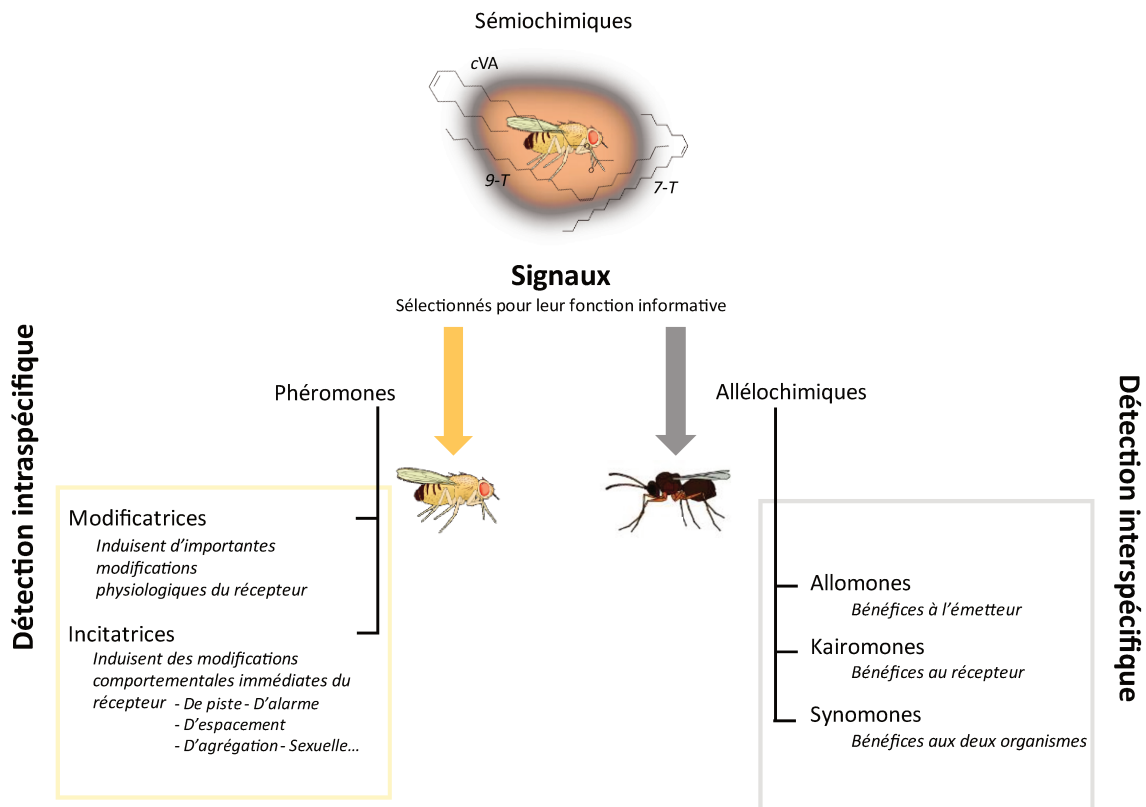


Figure 1 – Classification des molécules sémiochimiques

Toute molécule impliquée en communication chimique et ayant valeur de signal entre êtres vivants est qualifiée de **sémiochimique**.

Les **phéromones** sont une sous-classe de sémiochimiques utilisées en communication entre individus d'une même espèce. La première définition en a été donnée par **Karlson & Lüscher, (1959)** et elles représentent ainsi « des substances sécrétées à l'extérieur d'un individu, perçues par un second de la même espèce et déclenchant une réponse spécifique telle qu'un comportement ou un processus développemental ».

L'émission de sémiochimiques peut cependant être détectée par des individus appartenant à une autre espèce que l'émetteur, et sont alors qualifiées de **allélochimiques**. Elles sont divisées en 3 catégories selon les coûts et bénéfices qu'en tirent émetteur et récepteur (**Dicke & Sabelis, 1988**) :

- Des signaux interceptés par un récepteur hétérospécifique et qui ne profitent qu'à ce dernier sont qualifiés de **kairomones** (exemple des signaux émis par les larves de *Drosophila melanogaster* détectés par leur parasitoïde *Leptopilina heterotoma* - **Dicke et al., 1985**),
- Des signaux interceptés par un récepteur hétérospécifique et qui ne profitent qu'à l'émetteur sont qualifiés d'**allomones** (exemple, la pollinisation d'*Arum palaestinum* se fait par duperie de Drosophiles attirées par des composés issus de la plante et se rapprochant de composés fermentés - **Stökl et al., 2010**),
- Des signaux interceptés par un récepteur hétérospécifique et qui profitent à l'émetteur et au récepteur sont qualifiés de **synomones** (exemple, les Drosophiles mycophages sympatriques *D. falleni*, *recens*, *putrida* et *testacea* utilisent la même phéromone d'agrégation. Son dépôt par une des quatre espèces du groupe attire les trois autres et optimise l'exploitation commune de leur environnement - **Jaenike et al., 1992 ; Wertheim et al., 2005**).

Selon le contexte de leur utilisation et les conséquences déclenchées chez le récepteur, les phéromones peuvent être qualifiées respectivement de modificatrices ou d'incitatrices (**Wilson, 1965**). Les phéromones modificatrices provoquent des changements physiologiques à long terme du récepteur favorisant par exemple la puberté, l'ovulation ou encore la différenciation des castes chez les insectes sociaux. Les phéromones incitatrices déclenchent une réponse comportementale rapide et transitoire du récepteur (**Wilson, 1965**). On retrouve dans cette dernière catégorie les phéromones sexuelles, d'alarmes, de recrutement, d'agrégation, d'espacement ou de piste (**Law & Regnier, 1971**).

Initialement considérée comme étant innée (**Lorenz, 1950 ; Wilson, 1975**), la réponse comportementale aux phéromones peut cependant être conditionnelle et dépendante d'expériences précoces reçues par un individu au stade juvénile (**Beny & Kimchi, 2014 ; Everaerts et al., 2018 ; Wyatt, 2010**).

### **Phéromones dans l'environnement juvénile chez les Mammifères**

Chez les Mammifères, la période périnatale apparaît comme une période extrêmement plastique pour leur système olfactif. Rats, gerbilles, hamsters, souris domestiques et épineuses ou encore lapins non-sevrés sont en effet très sensibles aux odeurs de leur



environnement de nid qui induisent plus tard des préférences olfactives influençant leur comportement social et alimentaire (**Brown, 1982 ; Leon et al., 1977 ; Schaal et al., 2003**).

*In utero*, l'injection de jus de pomme et de chlorure de lithium (provoquant un état nauséeux) dans une rate porteuse déclenchera un comportement aversif du juvénile envers le jus de pomme à sa naissance (**Smotherman, 1982**). De la même manière, l'injection de chlorure de lithium chez des ratons de 2 jours en présence d'une odeur citronnée déclenchera chez eux une forte aversion pour celle-ci quand elle sera présentée à nouveau 6 jours plus tard (**Rudy & Cheate, 1977**). Lorsque des ratons sont élevés seuls pendant 2 semaines sur une litière parfumée et associée à un objet chaud, ils vont préférer cette même odeur comparée à une odeur naturelle de litière, montrant ainsi la nécessité d'une association entre environnements chimique et tactile de nid dans le renforcement d'une préférence olfactive chez le nouveau-né (**Alberts & May, 1984**).

Ces associations se traduisent ensuite par des préférences filiales puis sexuelles en fonction de l'âge du juvénile. Lorsqu'il est âgé de 2 semaines et donc capable de se déplacer, les odeurs de la mère déclenchent l'arrêt du jeune rat et son approche vers les mamelles (**Leon & Moltz, 1971, 1972**). Une fois adulte, les souris *Mus musculus* femelles élevées avec leurs deux parents montrent une préférence pour les odeurs de mâles, favorisant ainsi la recherche de partenaire de sexe opposé (**Brown, 1982**).

Ces expériences prouvent le rôle indispensable des environnements olfactifs et tactiles périnataux dans la construction d'un comportement social et alimentaire adapté chez le jeune. Les odeurs associées au nid lui permettent dès la naissance d'éviter les aliments toxiques, de localiser sa mère et les mamelles de celle-ci, puis une fois adulte d'être attiré par ses conspécifiques et discriminer efficacement leur sexe.

Cet aspect multifonctionnel des odeurs a été particulièrement étudié chez la phéromone mammaire de lapin, le 2-méthylbut-2-ène (2MB2) (**Coureaud et al., 2010**). Les mamelles de la lapine émettent en effet cette phéromone qui a pour rôle principal de déclencher l'approche et le comportement de succion chez le nouveau-né (**Pedersen & Blass, 1982; Rosenblatt, 1983; Teicher & Blass, 1976**). Chez le lapereau, la réponse orocéphalique (recherche/saisie orale des tétines maternelles)

déclenchée par le 2MB2 apparait comme extrêmement stéréotypée et ne nécessitant aucun apprentissage (**Schaal et al., 2003**). La réponse décroît progressivement sous contrôle prandial jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour du lapereau avant sa disparition complète à l'approche du sevrage (**Montigny et al., 2006**).

En plus de son rôle dans la communication mère-jeune, il a été découvert que cette phéromone agissait comme facilitatrice d'apprentissage chez le nouveau-né et que la présentation conjointe du 2MB2 avec une autre odeur (à l'origine neutre) confiait à celle-ci la même valeur appétitive que le 2MB2. Après une unique expérience d'acquisition, la nouvelle odeur déclenchait la réponse orocéphalique et perdurait jusqu'à 120h (**Coureaud et al., 2006**). Cet apprentissage permet notamment à l'individu de discriminer rapidement les membres de sa famille et une fois adulte de les éviter lors de sa recherche de partenaire sexuel.

L'implication du 2MB2 dans le déclenchement d'une réponse comportementale vitale, dans la reconnaissance des proches ainsi que dans l'apprentissage appétitif de nouveaux odorants chez le nouveau-né a permis à **Coureaud et al., (2010)** de la qualifier de phéromone « organisatrice » de la cognition néonatale du lapereau.

Il apparait à travers cet exemple que le rôle des phéromones peut évoluer en fonction du stade développemental pendant lequel un individu y est confronté et ainsi permettre successivement apprentissages associatifs et communications. La période juvénile est de plus une période privilégiée d'apprentissages pendant laquelle le système nerveux est extrêmement dépendant des expériences sensorielles perçues. Cette période de grande plasticité neuronale est qualifiée de période critique et détermine l'imprégnation des juvéniles aux signaux propres à leur espèce (**Salzen, 1967**).

## II - Imprégnation dans le monde animal

### Découverte du phénomène

L'imprégnation filiale a été initialement décrite par Lorenz et désigne un attachement social obligatoire et pérenne entre nouveau-né et parents chez les espèces d'oiseaux nidifuges (**Lorenz, 1935**). Chez le canard colvert *Anas platyrhynchos* et la poule domestique *Gallus gallus domesticus*, on observe une approche systématique du jeune vers le premier objet perçu, animé ou non, et se substituant à la mère. Très vite (1 à 2h - **Bateson et al., 1973**), le jeune préférera cet objet en cherchant activement son contact, le discriminant des nouveaux objets présentés et tentera plus tard de s'accoupler avec lui plutôt qu'avec des congénères (**Bateson, 1966 ; Bolhuis et al., 2015**). Initialement qualifiée de préférence sociale, l'imprégnation filiale se définit ainsi comme la restriction du comportement social à un objet particulier ou à une classe d'objet (**Bolhuis, 1991**).

La capacité d'imprégnation de certaines espèces d'oiseaux serait corrélée à l'existence de prédispositions pendant le stade juvénile à être plus sensible à certains stimuli. L'addition de lumières, mouvements, bruits, couleurs et formes particulières peuvent rendre l'approche du jeune vers l'objet et son imprégnation à celui-ci plus rapides (**Bateson, 1966 ; Hoffman, 1978 ; Smith & Bird, 1963**). Selon **Bolhuis et al. (1985)**, ces prédispositions seraient l'assurance que le juvénile oriente immédiatement son attention sur des caractéristiques communes et facilement identifiables de ses congénères (zone « tête et cou », chant - **Johnson & Horn, 1988 ; Rosa-Salva et al., 2010**) et lui permettrait d'apprendre une fois adulte à les discriminer sur la base de ces mêmes critères (**Candland, 1969**).

### Généralisation de l'imprégnation

Depuis cette découverte, de nombreux exemples d'imprégnations ont été identifiés dans la nature pouvant se référer à un large champ « d'objet » (filiale, alimentaire, sexuel, habitat, hôte) (**Darmaillacq et al., 2006 ; Hess, 1964 ; Immelmann, 1975b ; Jones et al., 1999 ; Kingsford et al., 2002 ; Sluckin, 1968**)

Ces observations ont permis aux auteurs de faire consensus sur 3 critères définissant l'imprégnation et la distinguant des autres processus de mémoires et d'apprentissages (notamment associatifs) :

- (i) L'existence d'une période temporelle stricte de grande plasticité cérébrale (i.e. la période critique) nécessaire à l'apprentissage de caractères propres à son espèce et à son environnement. Les imprégnations sociales, alimentaires et environnementales présentent des périodes critiques différentes mais coexistantes chez le même individu (**Hess, 1964; Salzen, 1967**). Elles sont marquées par des changements synaptiques et structurels des aires cérébrales intégrant les afférences sensorielles issues de l'objet d'imprégnation (**Berardi et al., 2004 ; Hensch, 2005**).
- (ii) Il s'agit d'un phénomène stable, persistant et qui ne nécessite pas de renforcements. La notion « d'irréversibilité » ayant fait débat (**Hess, 1959; Schein, 1963**), l'imprégnation apparaît en effet moins rigide qu'initialement décrite par **Lorenz (1935)** et permet par exemple aux oiseaux qui ne sont pas imprégnés à leur espèce d'accepter tout de même de s'accoupler avec des congénères lorsque leur objet d'imprégnation est absent (**Bateson, 1966**).
- (iii) Il n'existe pas de relation temporelle stricte entre la période d'acquisition et celle d'expression de l'imprégnation, la première ayant souvent lieu à un stade juvénile alors que la seconde survient généralement à l'âge adulte. L'hypothèse principale est que l'acquisition des informations se ferait pendant le stade juvénile d'un individu, lorsqu'il fait encore partie du groupe familial. Ses probabilités d'apprendre à reconnaître les signaux propres à son espèce seraient ainsi supérieures à celles du stade adulte, période pendant laquelle l'individu vit généralement seul ou en groupe restreint (**Immelmann, 1975a ; Sengpiel, 2007**).

Les exemples d'imprégnations se retrouvent dans de nombreux taxons : oiseaux (**Hess, 1964; Immelmann, 1975b**), rongeurs (**Sluckin, 1968**), poissons (**Darmaillacq et al., 2006; Jones et al., 1999; Kingsford, et al., 2002**), primates (**Salzen, 1967**) ou encore insectes (**Jaisson, 1973 ; Manning, 1967a ; Thorpe, 1939**) chez lesquels ce phénomène affecte des comportements primaires tels que les préférences alimentaires (**Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007 ; Karowe, 1989; Peralta Quesada & Schausberger, 2012**), d'oviposition (**Prokopy et al., 1982 ; Shikano & Isman, 2009**), de choix d'habitat (**Djipto-Lordon & Dejean, 1999**) et même de partenaire (**Anderson et al., 2013**).

Une des questions majeures se posant chez les Insectes holométaboles (i.e. accomplissant une métamorphose complète entre stade larvaire et adulte :

Coléoptères, Lépidoptères, Diptères, Hyménoptères) est de comprendre comment se maintient une préférence causée par imprégnation à travers les changements neuronaux et comportementaux drastiques engendrés par la métamorphose.

La Drosophile *Drosophila melanogaster* est un modèle particulièrement intéressant dans cette thématique car il s'agit d'un insecte holométabole, dont les processus neuro-éthologiques de l'olfaction et de la communication phéromonale sont bien documentés (**Dudai, 1985 ; Ferveur, 2005 ; Fishilevich & Vosshall, 2005 ; Greenspan & Ferveur, 2000 ; Vosshall & Stocker, 2007 ; Wolfner, 1997**).

### III - Système olfactif des Insectes

On retrouve chez les insectes une similarité d'architecture des systèmes de détection périphérique et de l'organisation centrale du système olfactif (**Galizia & Rössler, 2010**). On constate d'une part la répartition des détecteurs chimiosensoriels sur des zones restreintes du corps et d'autre part une organisation générale commune du connectome cérébral (lobe antennaire divisé en gloméruli projetant sur les corps pédonculés et la corne latérale) (**Zhao & McBride, 2020**).

Schématiquement, la détection chimiosensorielle chez les Insectes se fait via des soies chimiosensibles appelées sensilles (**Stocker, 1994**). Visualisables par microscopie à balayage électronique, les sensilles olfactives (de quelques centaines à une dizaine de milliers selon l'espèce considérée) sont concentrées sur les antennes et les palpes maxillaires (**Figure 2 – A et B**) (**Steinbrecht, 1970, 1996**). Elles se définissent comme des unités fonctionnelles abritant un ou plusieurs neurones sensoriels (ORN) baignant dans une lymphe sensillaire et associé(s) à des cellules accessoires (cellules tricogène, thormogène et thécogène). Ces dernières assurent l'environnement fonctionnel de la sensille en produisant lymphe, protéines chimiosensibles (CSP), protéines de ligation d'odorants (OBP) et enzymes de dégradation ayant pour rôles principaux d'acheminer les odorants jusqu'aux récepteurs olfactifs situés sur la membrane dendritique des ORN puis d'assurer leur désactivation et leur élimination.

#### **Classification morphologique, spatiale et fonctionnelle des sensilles**

Une prédiction du rôle de la sensille en fonction de sa morphologie est proposée dès 1980 par **Altner & Prillinger** :

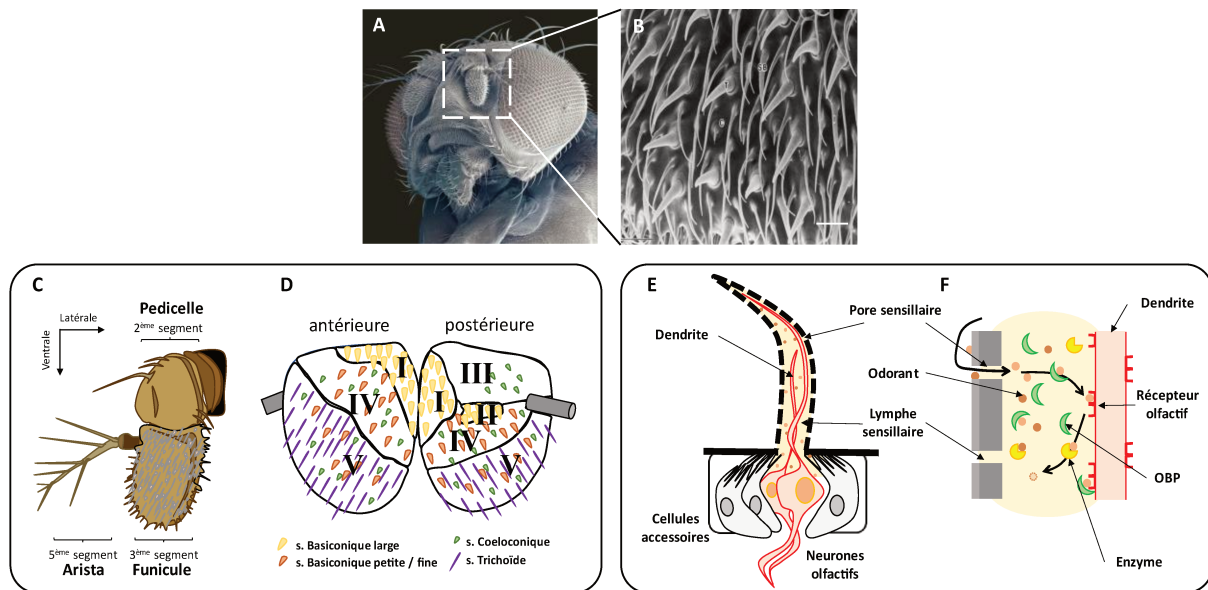
- Les sensilles chimioréceptrices se distinguent des sensilles mécanoréceptrices car elles présentent un ou plusieurs pores au travers de leur paroi.
- Les sensilles gustatives possèdent un pore apical ou une couronne de pores apicaux. Elles contiennent un neurone mécanosensible ainsi que 4 à 5 neurones chimiosensoriels.
- Les sensilles olfactives (pouvant abriter jusqu'à une centaine de neurones sensoriels (**Nakanishi et al., 2010**)) présentent plusieurs pores le long de leur soie.

**Chapman (1998)** classe les sensilles olfactives en 4 catégories, réparties sur le funicule. :

- (i) Les *sensilles trichoïdes* possèdent les soies les plus longues (19 à 24  $\mu\text{m}$ ) et sont présentes sur les antennes, pattes et organe de ponte. Chez *Drosophila melanogaster*, 4 types sont répartis sur la zone disto-latérale antérieure et postérieure du funicule (**De Bruyne et al., 2001 ; Lin & Potter, 2015**). Leur nombre total présente un dimorphisme sexuel (166 +/- 7 chez les mâles contre 144 +/- 8 chez les femelles) (**Shanbhag et al., 1999**).
- (ii) Les *sensilles basiconiques*, plus courtes, sont présentes majoritairement sur les antennes. Chez la Drosophile, ce type de sensilles est le plus abondant. Elles sont distinguables par microscopie optique entre larges, fines et petites basiconiques selon leur taille et le nombre de neurones sensoriels qu'elles abritent (**Couto et al., 2005; De Bruyne et al., 2001**). Les basiconiques larges sont cloisonnées dans une zone médiale proximale du funicule ; les petites et fines basiconiques sont présentes sur tout le funicule sauf dans la zone à large basiconique et sur la partie latérale distale.
- (iii) Les *sensilles cœloconiques*, de petite taille, sont très poreuses et constituées de « doigts » cuticulaires fusionnés. Chez la Drosophile, 8 types sont référencés et aléatoirement dispersés sur les antennes.
- (iv) Les *sensilles intermédiaires*, de taille comprise entre celle des sensilles trichoïdes et des sensilles basiconiques. Chez la Drosophile, elles sont une vingtaine sur chaque antenne et se répartissent sur la surface antérieure de celles-ci.

Le funicule présente une division de son champ olfactif en 5 régions selon les populations sensillaires majoritaires (**Figure 2**).





**Figure 2** – Schématisation du système olfactif périphérique antennaire de *D. melanogaster* (A) Face antérieure de *Drosophile* présentant les funicules riches en sensilles olfactives. (B) Cliché par microscopie électronique de la surface du funicule permettant de visualiser la diversité sensillaire (adapté de **Shanbhag et al., 1999**). (C) Schéma de l'antenne de *Drosophile* présentant les différents segments. (D) Champ olfactif funiculaire divisé selon la population sensillaire majoritaire (adapté de **De Bruyne et al., 2001**). (E) Schématisation d'une sensille olfactive avec détail (F) de la prise en charge d'une molécule odorante dans la lymphe sensillaire par une OBP jusqu'à sa fixation aux récepteurs olfactifs puis sa dégradation par des enzymes de dégradation d'odorants.

En plus de cette classification spatiale et morphologique des sensilles, une dernière forme de classification peut être réalisée selon les fonctions qu'elles assurent.

- Les *sensilles trichoïdes* sont référencées comme permettant la détection d'odeurs phéromonales (**Dweck et al., 2015 ; Lin et al., 2016 ; Soo Ha & Smith, 2006 ; van der Goes van Naters & Carlson, 2007**).
- Les *sensilles coeloconiques* semblent être dédiées à la détection d'odeurs de décomposition issues de matières fermentées (putrescine, amines, ammoniacque et acide phénylacétique) et sont de plus hygrosensibles (**Grosjean et al., 2011 ; Min et al., 2013 ; Yao et al., 2005**).
- Les *sensilles basiconiques* présentent un spectre plus large de détection d'odorants car elles sont à la fois impliquées dans la reconnaissance de la nourriture (**Dobritsa et al., 2003 ; Dweck et al., 2015**), du CO<sub>2</sub> (**Dobritsa et al., 2003**) et du 9-tricosène (hydrocarbure cuticulaire mâle) (**Lin et al., 2015**).

## **Fonctionnement des sensilles et récepteurs**

Les molécules odorantes doivent traverser la lumière sensillaire riche en lymphe après leur entrée par le pore ou le tubule sensillaire.

Découverte chez *Antheraea polyphemus* (**Vogt & Riddiford, 1981**), les OBP sont des protéines solubles de faible poids moléculaire (17 kDa) sécrétées par les cellules accessoires. Elles jouent un rôle principal dans la solubilisation, le transport, la reconnaissance et la désactivation de composés odorants lorsqu'elles ont pénétré dans la lymphe (**Ziegelberger, 1996**). La désactivation finale de la phéromone est permise par des enzymes présentes dans la lymphe (**Kaissling, 1974 ; Vogt & Riddiford, 1981**).

On distingue les Protéines de liaison de phéromone (PBP) principalement affines avec leur ligand phéromonal (**Prestwich et al., 1995**), des protéines générales de liaison d'odorants (GOBP1 et 2) présentant un plus large spectre de ligands (**Steinbrecht et al., 1995 ; He et al., 2010**).

Les récepteurs olfactifs appartiennent à trois classes principales et agonistes de récepteurs : les récepteurs odorants (Or) (**Clyne et al., 1999**), ionotropiques (Ir) (**Benton et al., 2009 ; Croset et al., 2010**) et phéromonaux (Pr) (**Benton et al., 2007; Wicher & GroBe-Wilde, 2017**).

Les protéines qui constituent les Or et Pr partagent le même schéma d'organisation et sont formées de 7 domaines transmembranaires, d'une extrémité N-terminale intracellulaire et d'une extrémité C-terminale extracellulaire. Leur fonctionnement dépend dans de nombreux cas de leur hétérodimérisation avec un co-récepteur *Orco* (Or83b) (**Larsson et al., 2004**) et le concours d'un troisième élément non essentiel - la protéine de membrane de neurone sensoriel ou SNMP – dans le cas des Pr, participant à la fois à la réception de la phéromone et à la cinétique de réponse du neurone (**Cassau & Krieger, 2021**).

Lors de la fixation d'un composé odorant, les Or présentent une première phase d'activité rapide et transitoire en formant un canal ionique passant Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> (voie ionotropique). Une deuxième phase d'activité prolongée fait intervenir une protéine G couplée au récepteur, elle-même induisant la production de cAMP activant un canal ionique nucléotidique cyclique et causant finalement la dépolarisation du neurone olfactif (voie métabotropique) (**Wicher et al., 2008**). Les Pr, semblables aux Or, fonctionnent quant à eux par voie ionotropique ou métabotropique selon l'organisme considéré (**Nolte et al., 2013 ; Sato et al., 2008**). Les Ir enfin, exprimés

jusqu'à 5 différents sur un même OSN, fonctionneraient par voie ionotropique en se polymérisant **(Abuin et al., 2011 ; Benton et al., 2009)**.

On recense finalement chez la Drosophile, 60 gènes *Or* codants pour 62 Or, répartis parmi les 1200 ORN contenus dans les 500 sensilles que compte chaque funicule **(Shanbhag et al., 1999)**.

Chaque Or interagissant avec un certain nombre de ligands et chaque odeur interagissant avec un certain nombre d'Or, l'identité d'une odeur est ainsi encodée par un ensemble simultané d'activation et d'inhibition de différents groupes d'Or **(De Bruyne et al., 2001 ; Hallem et al., 2004 ; Malnic et al., 1999)**.

### **Glomérules et spatialisation de la réponse cérébrale**

Les neurones olfactifs projettent leur axone vers les lobes antennaires (AL) du système nerveux central de la Drosophile où ils font synapses avec des neurones de projections (PN) dans des clusters neuronaux sphériques et topographiquement fixes appelés glomérules **(Laissue et al., 1999)**. Les ORN exprimant les mêmes Or convergent vers un des 43 glomérules des AL (sauf les Or33b et 67d qui ciblent deux glomérules) et ceux exprimant des OR homologues projettent vers des glomérules voisins, représentant ainsi le premier relai du système olfactif de la Drosophile **(Couto et al., 2005 ; Fishilevich & Vosshall, 2005 ; Tsuboi et al., 1999)**. L'activité des glomérules, dépendante de l'activation des ORN qui les innervent, apparaît comme stéréotypée car elle évoque le même type de réponse entre individus **(Wilson et al., 2004)**. L'identité des odorants est ainsi codée spatialement (des classes de composés différentes activent des réseaux différents de glomérules) et temporellement (des composés appartenant aux mêmes classes activent des réseaux similaires de glomérules mais avec des temporalités différentes) **(Lei et al., 2004)**.

L'information reçue par les glomérules n'est cependant pas immédiatement transmise aux relais supérieurs. Les AL représentent en effet des sites de grande complexité synaptique où l'information reçue des ORN est temporellement modifiée par « *cross-talk* » entre glomérules **(Wilson et al., 2004)** : au sein des AL, les glomérules font synapses « horizontalement » avec des interneurons locaux (LN) et « verticalement » avec les PN cholinergiques. Les LN établissent des synapses avec les ORN et les PN, la transmission d'un influx nerveux des ORN aux PN s'accompagne d'une excitation post-synaptique des LN qui relarguent alors des neurotransmetteurs. Plusieurs de

ces LN produisent de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA - neurotransmetteur inhibiteur) **(Wilson & Laurent, 2005)**, d'autres sont cholinergiques (neurotransmetteur excitateur) **(Shang et al., 2007)**. Leur rôle principal serait finalement de synchroniser l'activité des PN entre glomérules par une mosaïque d'excitation et d'inhibition intra- et inter-glomérulaires **(Ng et al., 2002)** et ainsi extraire l'information comportementalement pertinente en modifiant sa structure temporelle avant envoi aux centres supérieurs d'intégration **(Wilson et al., 2004)**.

### **Les centres supérieurs d'intégration olfactive**

Les PN projettent leur axone à travers les tracti antenno-cérébraux médians (mACT) et internes (iACT) vers les deuxièmes relais du système olfactif de la Drosophile. Les PN du mACT projettent directement dans le protocérébron, ceux du iACT se ramifient au niveau de la corne latérale (LH) et des lobes pédonculés (MB pour *Mushroom Bodies*) **(Figure 3) (Stocker, 1994)**.

Les MB sont des structures polylobées appariées constituées de neurones intrinsèques appelés cellules de Kenyon. Leur corps cellulaire est situé dans la zone postérieure dorsale du cerveau de la Drosophile où ils reçoivent les afférences olfactives des AL dans le calyx. Les axones des PN y font en effet synapses avec environ 2500 cellules de Kenyon (KC) dans 3 zones stéréotypées du calyx **(Yusuyama et al., 2002)**. Les cellules de Kenyon, arborisant leur dendrite dans les trois zones du calyx, contactent les PN provenant de plusieurs glomérules des AL suggérant l'intégration simultanée de l'information provenant du niveau inférieur **(Tanaka et al., 2004)**. La réponse extrêmement rapide et concentrée des cellules de Kenyon comparée aux réponses plus lentes et éparées des PN validerait l'hypothèse que les MB seraient des détecteurs de coïncidences leur permettant d'interpréter l'activité combinée de plusieurs PN **(Galarreta & Hestrin, 2001 ; Perez-Orive et al., 2002)**.

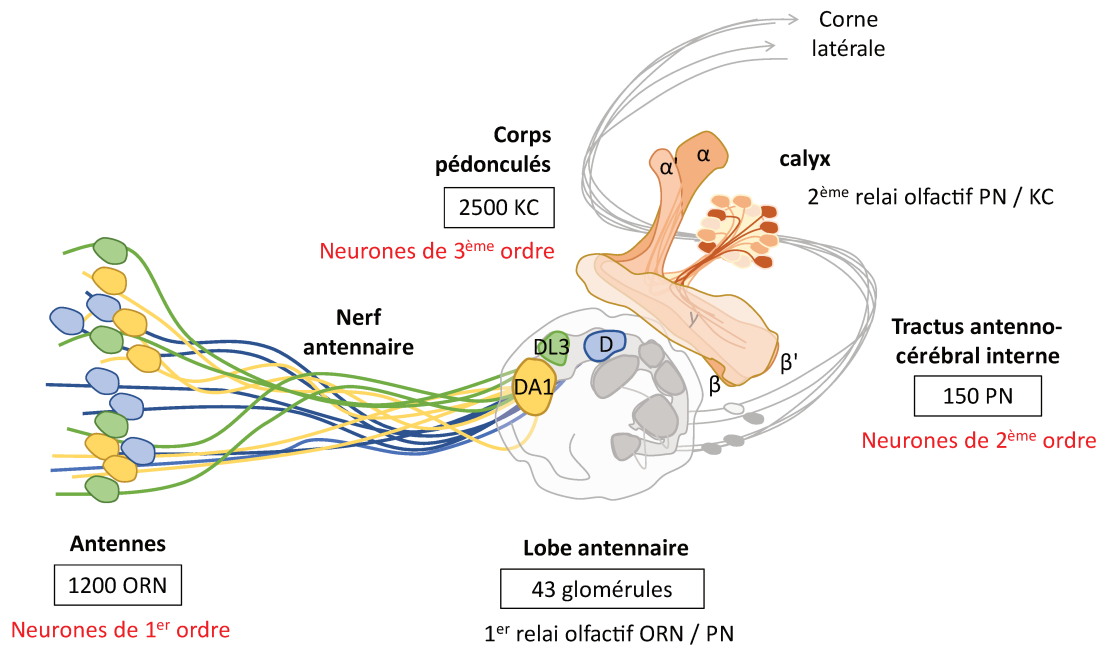


Figure 3 – Schématisation du Système Nerveux olfactif central de *D. melanogaster* adulte.

Les MB sont finalement le siège de régulation d'un ensemble de comportements vitaux pour la Drosophile, incluant notamment l'endormissement (**Joiner et al., 2006 ; Pitman et al., 2006**), l'expression d'un comportement sexuel mâle conditionné (**McBride et al., 1999 ; Sakai & Kitamoto, 2006**) et différentes formes de mémoires dont la mémoire olfactive (**Davis, 1993, 2005 ; de Belle & Heisenberg, 1994 ; Dubnau et al., 2001 ; Heisenberg et al., 1985**).

### Mémoires olfactives

L'apprentissage se définit comme la modification d'un comportement en réponse à un stimulus et la mémoire comme le maintien de cet apprentissage dans le temps. Son stockage prend la forme de changements d'activités cellulaires et synaptiques (traces) dans les circuits neuronaux sous-tendant l'apprentissage, avec comme finalité de modifier la réponse du système nerveux et l'expression comportementale au stimulus initial (**Lamprecht & LeDoux, 2004**).

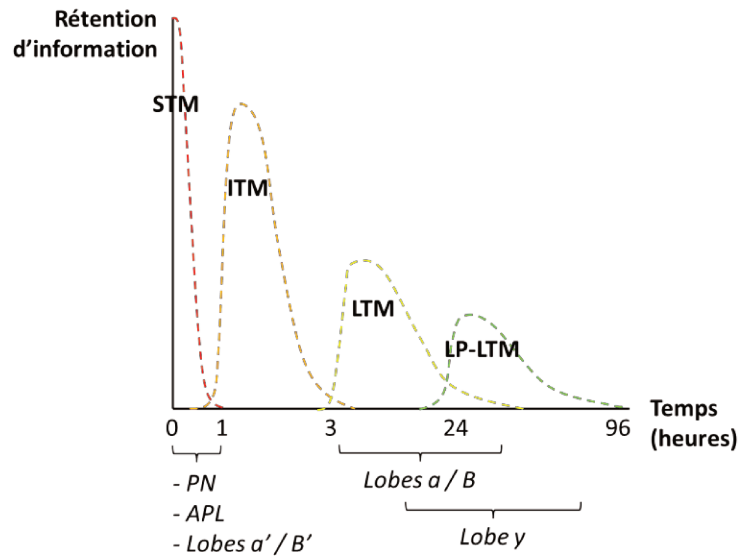
La Drosophile est un modèle extrêmement puissant qui permet l'accès aux gènes et molécules gouvernant la formation, le maintien et la restitution d'une mémoire olfactive (**Dudai, 1985**).

Les premiers tests de mémoire olfactive avaient pour but de mesurer les performances d'apprentissage de *Drosophiles* soumises à un choix entre (i) une odeur aversive (punie par un choc électrique) et une odeur neutre ou (ii) une odeur attractive (récompensée par une solution sucrée) et une odeur neutre après un **(Quinn et al., 1974 ; Tully & Quinn, 1985)** ou plusieurs **(Beck et al., 2000 ; Schwaerzel et al., 2003)** cycles de renforcement. Un cycle est composé de la présentation courte d'une odeur (1 min) immédiatement punie ou récompensée. Le comportement généré est le témoin de la formation d'une mémoire à court et moyen terme (STM) **(Figure 4)**.

Après un cycle de renforcement, un relargage de neurotransmetteurs dans tous les glomérules des AL (même ceux ne répondant pas à l'odeur seule) ainsi qu'un recrutement supplémentaire de PN dans les glomérules répondant à l'odeur est visualisable. Cette trace, extrêmement éphémère, et n'apparaissant ni en amont (dans les ORN) ni en aval (dans les LN) des AL **(Yu et al., 2004)**, a ainsi fait des lobes antennaires de bons candidats comme premier siège de la mémoire à court terme **(Davis, 2005, 2011)** et des PN le siège de synergie entre stimuli chimiques et électriques **(Das et al., 2017)**.

L'information qui résulte du choc électrique est ensuite transmise aux MB par l'intermédiaire de neurones dopaminergiques **(Schwaerzel et al., 2003)** connus pour innervent plusieurs zones du cerveau des *Drosophiles* **(Mao & Davis, 2009)** et fait des MB le deuxième siège de formation d'une mémoire à court terme. La formation d'une trace cellulaire en réponse à un apprentissage court a en effet été détectée dans les axones des cellules de Kenyon innervant les lobes  $\alpha'$  et  $\beta'$ , se traduisant par un influx calcique dans ces neurones et perdurant au moins 1h après l'entraînement. Ces réponses nécessitent plusieurs acteurs moléculaires sous contrôle génétique, dont les gènes *dunce* **(Chen et al., 1986)**, *rutabaga* **(Levin et al., 1992)**, *gilgamesh* **(Tan et al., 2010)**, *fasII* **(Cheng et al., 2001)**, *volado* **(Grotewiel et al., 1998)** et *leonardo* **(Skoulakis & Davis, 1996)** ainsi que l'activation, par la voie cAMP, d'une protéine kinase A **(Skoulakis et al., 1993)**.

Ces phénomènes sont finalement permis par diminution d'activité des neurones GABAergiques antérieurs latéraux appariés (APL), lesquels, hors apprentissage, agissent comme suppresseurs de formation de mémoire en inhibant les MB **(Liu & Davis, 2009)**.



**Figure 4** – Modèle de formation des traces mnésiques après un conditionnement olfactif classique (adapté de **Davis, 2011**). La création d'une mémoire olfactive après un conditionnement espacé comprend la formation d'une mémoire à court terme (STM), intermédiaire (ITM), à long terme (LTM) et tardive (LP-LTM). Les traces neuronales de la STM, coexistantes, se forment chronologiquement dans les neurones de projections des lobes antennaires (PN : 0-5 min), dans les neurones GABAergiques antérieurs latéraux appariés (APL : 0-5 min) et dans les lobes  $\alpha'$  et  $\beta'$  des corps pédonculés (MB : 0-1h). Une trace neuronale de la LTM se forme dans les lobes  $\alpha$  et  $\beta$  des MB (9-24h). Une trace de la LP-LTM se forme dans le lobe  $\gamma$  des MB (18-48h).

La formation d'une mémoire à long terme (LTM) - qui perdure jusqu'à 7 jours - nécessite entre 5 et 10 répétitions des cycles d'entraînements espacés de plusieurs minutes (**Tully et al., 1994 ; Yu et al., 2006**). Elle se formerait dans les lobes verticaux  $\alpha$  et  $\beta$  où une trace persistante y est observable entre 9h et 48h après un apprentissage répété et espacé (**Pascual & Préat, 2001 ; Yu et al., 2006**). Elle se caractérise de nouveau par le concours de nombreux éléments neuroanatomiques, génétiques et moléculaires (**Akalal et al., 2010, 2011 ; Davis, 2011 ; Yin et al., 1994 ; Yu et al., 2006**).

Une forme plus tardive et persistante de mémoire à long terme (LP-LTM), apparaissant entre 18h et 48h après un entraînement répété, a finalement été découverte dans le lobe  $\gamma$  (**Akalal et al., 2010**).

## **IV - *Drosophila melanogaster***

### **Origines et mode de vie du modèle d'étude**

*D. melanogaster* est un organisme originaire d'Afrique sub-Saharienne décrit par Meigen en 1830 (**David et al., 2007**), rapidement étendu au reste du monde grâce aux flux humains et à sa grande capacité d'adaptation (**Ayrinhac et al., 2004 ; Folguera et al., 2008 ; James & Partridge, 1998 ; Strataman & Markow, 1998**). Sa diffusion hors d'Afrique s'est d'abord faite en Asie (il y a environ 15 000 ans) puis en Australie et Amérique du Nord (**David & Capy, 1988**).

Son utilisation en laboratoire remonte au début du XXème siècle avec les travaux de Charles Woodworth et William Castle. Ils ont été suivis de Thomas Hunt Morgan, pionnier en génétique et Alfred Henry Sturtevant, les premiers à avoir cartographié les gènes de la Drosophile (**Carlson, 2013; Roberts, 2006**). Cinq prix Nobel (1933, 1946, 1995, 2011 et 2017) récompenseront les avancées majeures physiologiques, génétiques et médicales permises par *D. melanogaster* (**Markow, 2015**).

*D. melanogaster* fait partie de la « guilde de Drosophiles cosmopolites » (**Nunney, 1996**), s'alimentant et pondant aux côtés de *D. busckii*, *D. simulans*, *D. hydei*, *D. immigrans* et *D. funebris* sur des fruits en décomposition (**Atkinson & Shorrocks, 1977**). Bien qu'interagissant avec les autres espèces, *D. melanogaster* colonise le fruit à une période précise de sa décomposition, arrivant deuxième après *D. simulans* (**Nunney, 1996**). Celle-ci est en effet moins tolérante à l'éthanol et s'alimente avant que la fermentation du fruit ne soit trop avancée (**McKenzie & Parsons, 1972**).

Ce contexte de grande proximité fait que les œufs et larves de Drosophiles, dès les premiers stades, évoluent dans un environnement chimique extrêmement varié qui mêle odeurs d'individus conspécifiques et/ou hétérospécifiques, de microorganismes et de fruits (**Corby-Harris et al., 2007 ; Dweck et al., 2015 ; Keesey et al., 2016 ; Wright, 2015**).



## Phéromones de la Drosophile

Chez la Drosophile, la communication et la reconnaissance entre partenaires sont multimodales et se font principalement par échanges de signaux visuels, acoustiques et chimiques (**Greenspan & Ferveur, 2000**).

La communication phéromonale chez *D. melanogaster* admet actuellement 4 classes identifiées de composés (**Billeter & Wolfner, 2018**), dont 3 sont majoritairement détectées par le système olfactif (**Figure 5**) :

- Les hydrocarbures cuticulaires (**Antony & Jallon, 1982**) principalement détectés par le système gustatif, ainsi que leurs produits volatiles d'oxydation ((Z)-4-undécénal - **Lebreton et al., 2017**),
- Les phéromones séminales mâles provenant du bulbe éjaculatoire (*cis*-Vaccényl Acétate – **Butterworth, 1969** ; 3-O-acétyl-1,3-dihydroxy-octacos-11,19-diène - **Yew et al., 2009**),
- Les phéromones séminales mâles provenant des glandes accessoires (peptide sexuel - **Chen et al., 1988 ; Wolfner, 1997**) et agissant comme allohormones lors de leur transfert à la femelle pendant l'accouplement (**Wyatt, 2014**),
- Les phéromones dérivées d'acides gras (méthyl laurate ML, palmitate MP et myristate MM - **Dweck et al., 2015**) d'origine encore non identifiée.

Femelles				Mâles			
Ligands	Récepteurs	Glomérules	Comportements	Ligands	Récepteurs	Glomérules	Comportements
9-T	Or7a	DL5	Agrégation, Oviposition	9-T	Or7a	DL5	Agrégation
cVA, cVA	Or65a	DL3	Module réceptivité sexuelle	cVA, cVA	Or65a	DL3	Module parade, Agressivité
cVA	Or67d	DA1	Module réceptivité sexuelle, Agrégation	cVA	Or67d	DA1	Agrégation, Agressivité
ML, MP, MM ML, MP, MM	Or47b	VA1v	Agrégation	cVA	Or67d	DA1	Répulsion
Z4-11Al	Or69ab	D	Agrégation	ML	Or47b	VA1v	Parade
				ML, MP, MM ML, MP, MM	Or47b	VA1v	Agrégation
				Z4-11Al	Or69ab	D	Agrégation, Module parade

Sources des ligands

Mâles

Femelles

**Figure 5** - Modalités d'échanges des signaux phéromonaux olfactifs chez *D. melanogaster* et comportements qui en découlent chez les deux sexes (adapté de **Auer & Benton, 2016**). 9-T : 9-tricosène, cVA : *cis*-Vaccényl Acétate, ML : méthyl laurate, MP : méthyl palmitate, MM : méthyl myristate, Z4-11Al : (Z)-4-undécénal.

### **Les hydrocarbures cuticulaires (HC)**

Le rôle premier des HC, présents à la surface de la cire cuticulaire, est d'assurer l'intégrité de l'insecte en limitant ses pertes hydriques (**Krupp et al., 2020**) et en le protégeant d'organismes entomopathogènes. Leur évolution en tant que signaux de communication a été largement documentée (**Blomquist & Bagnères, 2010 ; Howard & Blomquist, 2005**) et décrite dans différents ordres d'insectes (Blattoptères : **Haverty et al., 1988 ; Jackson, 1970** - Lépidoptères : **de Renobales & Blomquist, 1983 ; Howard, 2001** - Hyménoptères : **Errard et al., 1989 ; Kather & Martin, 2015** - Hémiptères : **Calderón-Fernández et al., 2011** - Coléoptères : **Steiger et al., 2007** - Orthoptères : **Thomas & Simmons, 2011** - Diptères : **Ferveur & Cobb, 2010**) et chez les Araignées (**Grinsted et al., 2011**).

Leur implication en communication chimique est extrêmement variée (voir revue par **Blomquist & Bagnères, 2010**), allant de la reconnaissance de partenaires (phéromone sexuelle) à la détection d'un hôte par son parasite (kairomone) (**Colazza et al., 2007**), en passant par la création d'une signature chimique entre individus sociaux appartenant à la même colonie (**Dani et al., 2001 ; Martin et al., 2008**) et indiquant leur statut social (**Martin & Drijfhout, 2009 ; Monnin, 2006**).

Les HC possèdent une structure commune composée d'une longue chaîne carbonée (comprenant entre 19 et 50 carbones - **Akino, 2006**) pouvant être (i) saturée (alcane) ; (ii) insaturée (alcène) par une, deux voire trois insaturations (mono-, di- et tri- ènes) ; (iii) sous forme isomérique cis- (*Z*-alcènes) ou trans- (*E*-alcènes) ou enfin (iv) méthylée. La longueur de la chaîne carbonée ainsi que la position des insaturations et branchements méthylés impactent les propriétés physiques de l'hydrocarbure en modifiant son point de fusion, déterminant ainsi sa capacité à être volatile et son champ d'action dans des conditions naturelles (**Gibbs & Pomonis, 1995**).

Chez *D. melanogaster*, les HC représentent la classe majoritaire de phéromone (**Ferveur, 2005**). Leur chaîne carbonée comprend entre 20 et 36 carbones et peut présenter une insaturation (monoènes : 7-pentacosène **7-P**, 7-tricosène **7-T**, 9-pentacosène **9-P**, 9-tricosène **9-T**, 11-pentacosène **11-P**) ou deux insaturations (diènes : 7,11-heptacosadiène **7,11-HD** et 7,11-nonacosadiène **7,11-ND**) (**Antony & Jallon, 1982 ; Jallon, 1984 ; Pechine et al., 1985**).

Ces derniers sont responsables d'un dimorphisme sexuel des profils hydrocarbonés car seules les femelles possèdent la *desatF* nécessaire à leur biosynthèse (**Wicker-Thomas & Chertemps, 2010**).

La volatilité des HC est variable (**Farine et al., 2012**) et détermine leur distance d'action (**Auer & Benton., 2016**) :

- La communication phéromonale gustative permet la détection de composés cuticulaires peu ou pas volatiles que sont le 7-T, le 9-T et le 11-P produits par le mâle. La détection de ces composés déclenche chez le mâle des comportements agonistes (répulsion, agression) et stimule la réceptivité sexuelle chez les femelles (**Clowney et al., 2015 ; Wang et al., 2011**). Les composés femelles 7,11-ND et 7,11-HD sont perçus par le mâle et initient la parade sexuelle (**Clowney et al., 2015a**).
- La communication phéromonale olfactive fait intervenir le 9-T, produit mâle, perçu par l'Or7a et déclenchant l'agrégation chez les deux sexes (**Lin, et al., 2015**).

En plus du sexe, l'âge des Drosophiles est un second facteur interne modifiant la qualité et quantité des HC produits ainsi que la capacité des individus à les détecter (**Kuo et al., 2012**). Les femelles âgées produisent davantage de 7,11-HD (**Arienti et al., 2010 ; Bilen et al., 2013**) et les mâles âgés sont plus réactifs à la détection des phéromones femelles par sensibilisation de leur récepteurs olfactifs, leur conférant un avantage reproducteur sur les plus jeunes mâles (**Lin et al., 2016**).

Finalement d'autres facteurs, externes, tels que la température (**Savarit & Ferveur, 2002b**), le régime alimentaire (**Fedina et al., 2012 ; Murgier et al., 2019**) et les interactions sociales (**Everaerts et al., 2010 ; Farine et al., 2012**) altèrent aussi le profil hydrocarboné des Drosophiles (et donc leur détection) en modifiant la proportion relative de HC à courte et longue chaîne, faisant des HC une véritable « carte d'identité » malléable et témoin de l'espèce, du sexe, de l'âge et des expériences passées de l'individu (**Wyatt, 2010**).

### **Le cis – Vaccényl Acétate (cVA)**

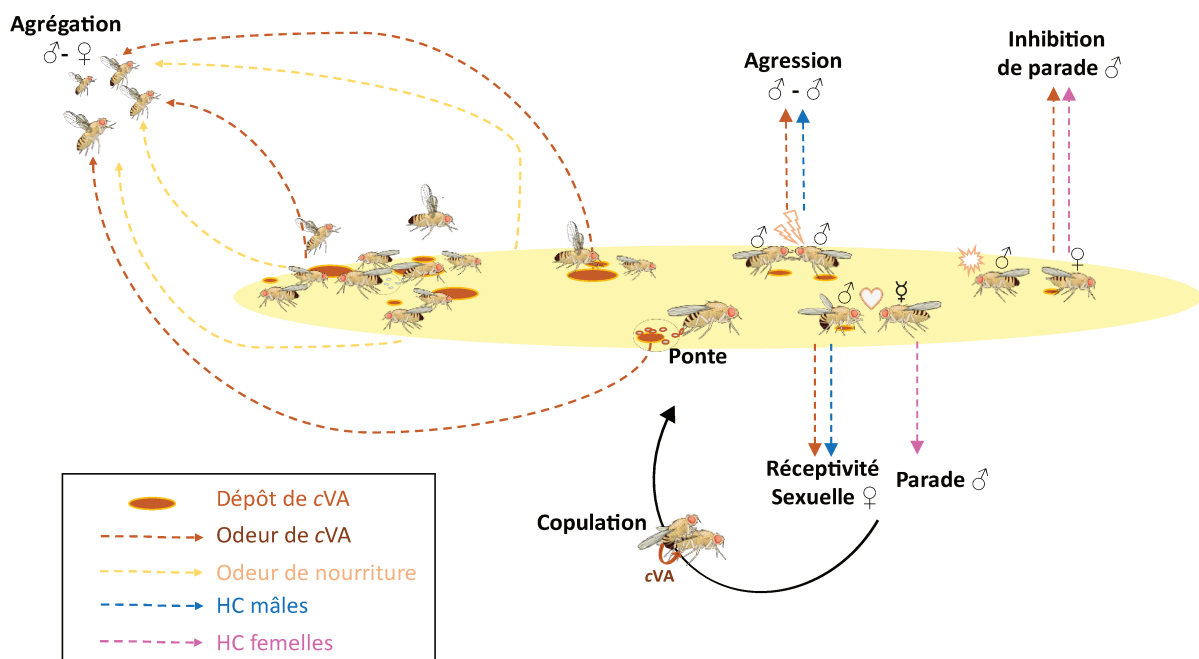
Le (Z) – 11 – octadécen – 1 – yl, plus communément appelé cis – vaccényl acétate ou cVA, est un composé non - cuticulaire découvert en 1969 par **Butterworth** mais identifié l'année suivante par **Brieger & Butterworth (1970)**.

Le cVA a été décrit chez une quinzaine d'espèces de Drosophiles (*D. ananassae*, *falleni*, *immigrans*, *mauritiana*, *melanogaster*, *phalerata*, *putrida*, *rajasekari*, *recens*, *simulans*, *subobscura*, *subquinaria*, *testacea* et *yakuba*) chez lesquelles il agit comme phéromone d'agrégation sur les deux sexes (**Bartelt et al., 1985 ; Hedlund, 1996; Jaenike et al., 1992; Schaner et al., 1987; Schaner et al., 1989a et b ; Symonds & Wertheim, 2005**).

Chez ces espèces, le cVA est une phéromone exclusivement produite par les mâles dans une structure spécialisée de leur appareil reproducteur appelée le bulbe éjaculateur. Il proviendrait de la désaturation de l'acide palmitique (précurseurs des HC) en acide palmitoléique dans les œnocytes (**Dallerac et al., 2000**), de l'élongation de ce dernier en acide vaccénique dans le tractus reproducteur mâle (**Chertemps et al., 2005**) et enfin de sa réduction en cVA par l'action d'une acétyltransférase dans le bulbe éjaculateur (**Guiraudie-Capraz et al., 2007**).

Chez *D. melanogaster*, ses effets sont qualifiés de pléiotropes par **Ejima (2015)** car ils interviennent dans la modulation de plusieurs interactions sociales et sexuelles. Lors de l'éjaculation, le cVA est transmis dans le tractus génital de la femelle (**Butterworth, 1969**) puis déposé par cette dernière sur le substrat de ponte en même temps que ses œufs. Une fois présent dans l'environnement, le cVA agit comme (i) une phéromone d'agrégation permettant l'attraction de mâles et femelles sur des sites de pontes et d'alimentation (**Bartelt et al., 1985 ; Wertheim et al., 2002 ; Xu et al., 2005**), (ii) un puissant anti-aphrodisiaque chez les mâles évitant les parades homosexuelles (**Everaerts et al., 2018 ; Griffith & Ejima, 2009 ; Zawistowski & Richmond, 1986**), (iii) un aphrodisiaque chez les femelles, stimulant leur réceptivité (**Kurtovic et al., 2007**), (iii) un modulateur de mémoire de parade hétérosexuelle évitant aux mâles de parader des femelles gravides (**Ejima et al., 2007; Zawistowski & Richmond, 1985**), et (iv) un régulateur de l'agressivité mâle-mâle (**Bentzur et al., 2018 ; Liu et al., 2011 ; Wang & Anderson, 2010 ; Wang et al., 2011**).

Il est cependant primordial de noter que le cVA n'a aucun effet lorsqu'il est présenté seul et que l'ensemble de ces comportements n'est modulé/déclenché que dans des contextes odorants particuliers (**Figure 6**) associant le cVA aux odeurs de nourriture et/ou de congénères de l'un ou l'autre sexe. En outre, la réponse comportementale déclenchée par cette association est dépendante du sexe de l'individu qui perçoit la phéromone. Cette caractéristique fait écho au caractère multifonctionnel de la phéromone mammaire de lapin (le 2MB2) et fait aussi du cVA une phéromone organisatrice au sens de **Coureaud et al., (2010)**.



**Figure 6** – Illustration de l'effet pléiotrope du cVA dans les populations naturelles de *D. melanogaster* (adapté de **Ejima, 2015**). A distance et combiné à des odeurs de nourriture, le cVA fonctionne comme phéromone d'agrégation sur les deux sexes. A proximité, pour un mâle : le cVA présent sur un autre mâle exacerbe son agressivité, le cVA présent sur une femelle accouplée agit comme anti-aphrodisiaque et déclenche le rejet de la femelle par celui-ci et l'absence de cVA sur une femelle stimule sa parade. Pour une femelle : le cVA présent sur un mâle favorise sa réceptivité sexuelle et conduit à leur accouplement. En pondant, la femelle dépose œufs et cVA hérité du mâle dans le substrat.

## V - Orientation et choix de nourritures en vol

### Le vol chez la Drosophile

Malgré sa taille extrêmement réduite, la Drosophile est capable de réaliser des vols supérieurs à 10 km d'un seul tenant (**Coyne et al., 1982**), en volant plus de 3 heures sans interruption (**Gotz, 1987**). Cette capacité dispersive, couplée au vol à contre-courant typique des insectes volants (**Baker et al., 1985 ; Finch & Skinner, 1982 ; Geier et al., 1999**), lui permet d'intercepter les panaches odorants émanant de sources de nourriture et de les atteindre efficacement en adaptant sa trajectoire par rapport aux vents (**Leitch et al., 2021**).

La première description du vol de la Drosophile a été faite il y a un siècle par **Barrows (1907)** qui décrit le vol en 2 étapes : l'orientation vers la source odorante et la remontée du panache d'odeur en zigzag (comportement appelé vol vibratoire).

Il consiste en de courtes excursions en avant et arrière, gauche et droite et de haut en bas de la mouche qui s'amenuisent à mesure qu'elle approche de la source odorante pour terminer en un vol rectiligne vers la source avant de se poser (**Murlis et al., 1992**). Le premier comportement nécessite pour l'individu d'apprécier la force et la direction du vent et d'estimer comment celui-ci affecte sa propre trajectoire. Cette évaluation est permise par intégration de perceptions mécanoréceptrices par l'organe de Johnston (**Budick et al., 2007**) et l'ajustement du corps de la mouche par réaction optomotrice (perçu visuellement comme une dérive latérale) (**Theobald et al., 2010**). Le deuxième comportement permet à la mouche de relocaliser le panache en favorisant les probabilités de le rencontrer à nouveau après en être sortie et de se rapprocher de la source odorante (**David et al., 1983 ; Van Breugel & Dickinson, 2014**).

### Etude du vol en laboratoire

En tunnel de vol, le panache émanant d'une source odorante reste aligné à la direction du vent et suggère que l'insecte testé les remonte conjointement (**Farkas & Shorey, 1972 ; Knudsen et al., 2018**). Contrairement à l'air libre, le vol en tunnel se décompose en 3 phases : (i) la remontée passive du courant d'air, entrecoupée d'arrêts fréquents de l'insecte sur les parois du tunnel pour se nettoyer pattes et antennes,

(ii) la remontée active et orientée du courant d'air suite à la détection d'une odeur et  
(iii) la mise en place d'un vol retour si le panache est perdu ou si la source odorante est dépassée (**Jang et al., 1994**).

Dans le cas où il n'y a pas de source visuelle d'odeur, une stratégie « *aim and shoot* » (viser et tirer) est observable : la direction du vent est déterminée lors du repos de l'insecte sur un support, puis celui-ci s'élance et dépasse généralement la source odorante. Un vol retour, permis par un virage à 180° est alors observable et permet à l'insecte de se resituer sous la source. Finalement, une série de dépassements et retours (avec des virages à 180° de plus en plus brefs) permet à l'insecte de localiser la source et d'y atterrir (**Bursell, 1984 ; Murlis et al., 1992**). Ce mouvement en zig-zag (analogue au vol vibratoire dans un environnement naturel) est caractéristique du mouvement de « contre-rotation » des insectes volants en réponse à un odorant et prouve que le tunnel de vol est une technique robuste pour étudier en laboratoire l'attraction de composés phéromonaux et le phénomène d'agrégation en résultant (**Cazalé-Debat et al., 2019 ; Jang et al., 1994 ; Knudsen et al., 2018**).

### **Agrégation chez la Drosophile**

Chez les insectes non-sociaux, l'agrégation se définit comme la réponse positive d'un individu à des stimuli émanant de l'association pérenne de deux ou plusieurs individus conspécifiques. La durabilité de cette association repose sur un ensemble de bénéfices-coûts pour chacun de ses membres, notamment dépendant du sexe et de la densité de conspécifiques réunis. Le « groupe » apparaît ainsi comme un ensemble dynamique, et le comportement d'agrégation comme un comportement plastique (**Prokopy & Roitberg, 2001**).

Chez *Drosophila melanogaster*, les zones d'accouplement sont les zones d'alimentation, et sont analogues aux leks des Vertébrés (**Baker, 1983 ; Taylor, 1988**). Les groupes sont initialement formés près de sources de nourritures larvaires, par des mâles qui répondent au cVA d'autres mâles et celui présent sur les œufs et aux odeurs de nourriture (**Bartelt et al., 1986 ; Hedlund, 1996 ; Jaenike et al., 1992**).

La concentration de cVA dans un environnement étant le reflet direct de la densité de population, on peut observer une plasticité de réponse à la phéromone selon le nombre d'individus présents (**Wertheim et al., 2002**).

A faible concentration, le cVA favorise l'attraction de femelles, leur ponte communale (**Chess et al., 1990**) se traduisant par la croissance optimale de leur descendant par

facilitation (plus de larves dégrade plus efficacement la nourriture), et l'attraction croisée de plusieurs espèces de Drosophiles (**Symonds & Wertheim, 2005**). A trop forte concentration, le cVA augmente le risque de parasitisme des larves (**Dicke et al., 1994 ; Hedlund et al., 1996 ; Wertheim et al., 2003**). La phéromone exacerbe de plus l'agressivité entre mâles, obligeant la dispersion des membres du groupe et permet de les maintenir à un taux optimal (**Wang & Anderson, 2010**).

### **Attraction au cVA**

A distance, le cVA est reconnu par les mâles et femelles *D. melanogaster* grâce à leurs récepteurs Or65a et Or67d (**Soo Ha & Smith, 2006 ; van der Goes van Naters & Carlson, 2007**). Ces derniers sont situés sur la membrane de neurones olfactifs contenus respectivement dans les sensilles antennaires trichoïdes T3 et T1.

Dès la découverte de son effet agrégatif par **Bartelt et al., (1985)**, il a été montré que le cVA était attractif lorsqu'il est associé à des odeurs de nourriture. L'attraction à distance et le comportement d'agrégation reposent en effet sur la réception conjointe de phéromones (cVA +/- HC) et de dérivés alimentaires (produits de dégradation microbienne présente naturellement sur le milieu ou issu de la flore intestinale des Drosophiles) (**Becher et al., 2012 ; Keeseey et al., 2016**). En s'alimentant / déféquant / pondant sur de la nourriture, les individus vont déposer des phéromones et des microorganismes rendant celle-ci plus attractive qu'une nourriture intacte, et donnant une image fidèle du profil phéromonal des individus marqueurs (hydrocarbures mono/diènes et cVA pour les mâles et les femelles nouvellement accouplées).

L'attraction modulée par le cVA peut cependant être influencée par le sexe et l'état physiologique des individus sujets (**Lebreton et al., 2014, 2015**).

A jeun, les femelles favorisent la recherche de nourriture indépendamment de la présence de cVA, alors que les mâles y sont plus sensibles et préfèrent la nourriture enrichie en phéromone. Une fois rassasiées, les femelles deviennent sexuellement réceptives (leur fonction reproductrice étant dépendante de leur prise de nutriments (**Gorter et al., 2016**)) et préfèrent ainsi la nourriture additionnée de cVA, à l'opposé des mâles qui perdent leur préférence pour la phéromone (**Lebreton et al., 2015**).

Récemment accouplées, les femelles ne sont plus attirées par le cVA mais uniquement lorsque la dose de phéromone reçue du mâle lors de l'accouplement est suffisante. Celle-ci étant notamment dépendante de l'état de satiété du mâle (**Lebreton et al., 2014**) et de son âge (**Cortot et al., 2022**).



Après la période réfractaire suivant l'accouplement, les femelles sont de nouveau attirées par la phéromone (**Wertheim, 2001**), celle-ci influençant leur distribution dans l'environnement de ponte (**Chess et al., 1990**). Plusieurs auteurs soulignent en effet la création de groupes de femelles hétérospécifiques pondant de manière agrégée sur les substrats enrichis en cVA (**Bartelt et al., 1986 ; Jaenike & James, 1991**). Celui-ci proviendrait en majorité de l'éjection sélective des pontes et du bouchon copulatoire (i.e. résidus de spermés et protéines transférés du mâle à la femelle, éjectés par celle-ci quelques heures après l'accouplement et riches en phéromones) par d'autres femelles récemment accouplées et contenant de très fortes doses de cVA (**Amrein, 2004 ; Bailly et al., 2021 ; Duménil et al., 2016 ; Wertheim et al., 2002**).

### **Choix de nourritures**

Les récents travaux de **Cazalé-Debat et al. (2019)** ont permis d'analyser plus en détail la part respective des HC et du cVA impliqués dans l'attraction à distance de mouches soumises à un choix entre nourriture vierge et nourriture marquée par des conspécifiques, ainsi que les différences spécifiques aux sexes de ce comportement :

- Chez les deux sexes, l'envol serait stimulé par la détection à distance de composés très volatiles issus de la nourriture et le rapprochement vers la source de nourriture par la détection de HC à longue chaîne (ou de produits plus volatiles de leur dégradation).
- Les atterrissages montrent ensuite des différences entre sexes.
  - Les mâles et les femelles sont sensibles à la présence de « HC mâles » sur la nourriture, et vont préférer celle-ci à de la nourriture vierge.
  - L'opposition d'une nourriture enrichie en « HC femelles » face à une nourriture « HC femelles + cVA » favorise l'atterrissage des femelles sur cette dernière mais pas des mâles.
  - Les « HC femelles » opposés à une nourriture vierge seront préférés par les mâles mais pas par les femelles.

Les femelles apparaissent ainsi plus sensibles à la présence de cVA dans ce paradigme, les mâles à la présence de HC femelles et les deux sexes à la présence de HC mâles.

## VI - Plasticité du système nerveux olfactif central chez la *Drosophile*

### Cycle de vie de la *Drosophile*

Le cycle de *D. melanogaster* se divise en quatre phases morphologiquement et comportementalement distinctes : le stade embryonnaire, les stades larvaires, le stade pupal et enfin le stade adulte. A 25°C la durée moyenne d'un cycle complet est d'une dizaine de jours ; il est cependant possible de la moduler en élevant les individus à 29°C (cycle complet de 8 jours) ou à 18°C (cycle complet de 16 jours) (**Figure 7**).

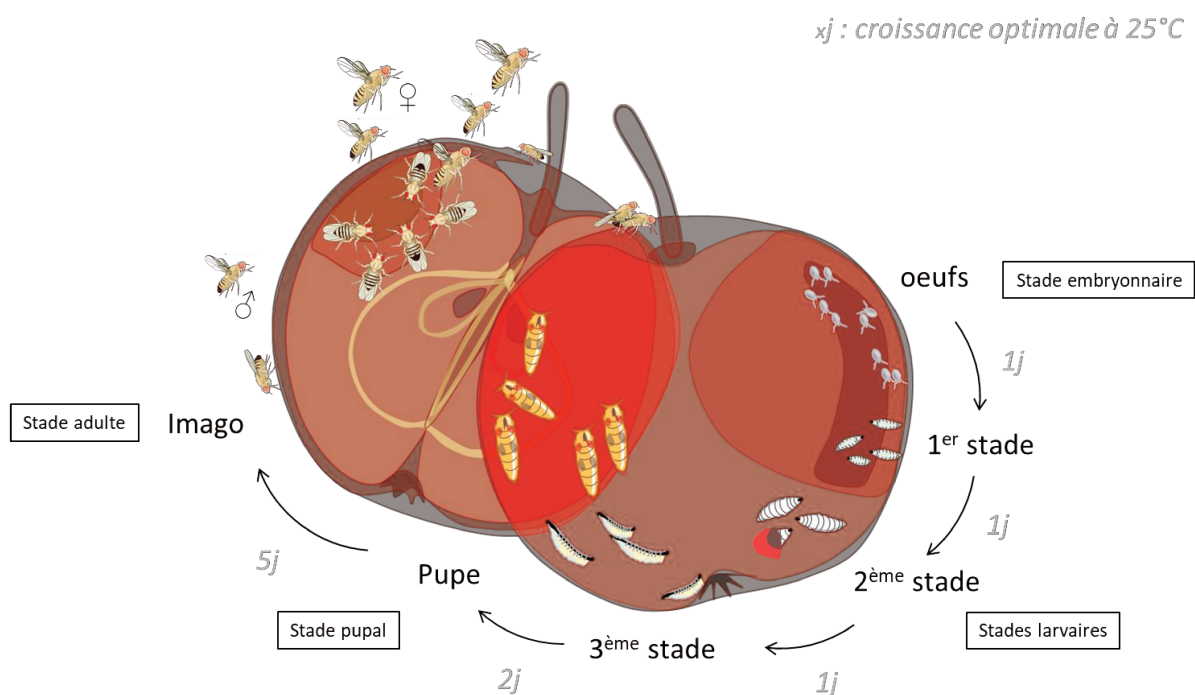


Figure 7 – Cycle de vie de *Drosophila melanogaster*

La phase pupale se caractérise par la métamorphose complète de la *Drosophile*, qualifiée par **Wilbur (1980)** de « changement ontogénique abrupt de la morphologie, de la physiologie et du comportement de l'individu, couramment associé à un changement d'habitat ». Cette métamorphose est associée à « la liquéfaction totale et anarchique » de la larve, se transformant en « soupe » d'où émergent les futurs organes adultes (**Jabr, 2012 ; Overdeck, 2022**), mais répond pourtant à un ensemble synchronisé de réactions hormonales et enzymatiques (**Rolff et al., 2019**).

L'épiderme (**Riddiford, 1978**), les systèmes nerveux et musculaires (**Lubischer et al., 1999 ; Weeks & Ernst-utzschneider, 1989**) sont ainsi remodelés à partir des tissus et organes larvaires.

Bien que la majorité des neurones larvaires du CNS soit vouée à disparaître pendant la métamorphose (neurones liés au comportement d'éclosion ou comportement larvaire en général ; neurones liés aux organes larvaires disparaissant), d'autres persistent et subissent un remaniement dendritique, fonctionnel et synaptique permettant de soutenir les changements drastiques d'environnement et de comportements adultes (**Tissot & Stocker, 2000; Truman & Reiss, 1976; White & Kankel, 1978**).

### **Les périodes critiques**

Chez la Drosophile, 2 périodes critiques de forte plasticité neurodéveloppementale ont été identifiées et succèdent aux 2 phases de neurogénèse connues chez les insectes holométaboles : (i) la phase embryonnaire qui permet la mise en place des neurones nécessaires à l'expression du comportement larvaire et (ii) la phase pupale permettant l'apparition des neurones adultes (**Dombrovski & Condron, 2020; Tissot & Stocker, 2000**).

La période critique adulte suit immédiatement l'émergence de l'adulte pharate hors de sa pupa. Durant moins d'une semaine (**Devaud et al., 2003**), elle se caractérise par la modulation du SNC olfactif de la Drosophile faisant suite à une exposition de plusieurs jours à des odorants. Le réarrangement des lobes antennaires qui en découle est qualifié d'adaptation centrale à long terme (LTCA) (**Golovin & Broadie, 2016**) et la résultante comportementale est qualifiée d'habituation olfactive à long terme (LTH) (**Das et al., 2011**).

Au niveau des lobes antennaires, la LTCA se traduit par une modification de la communication du système « ORN-PN-LN » (**Dombrovski & Condron, 2020**). La plasticité glomérulaire repose en effet sur l'action inhibitrice des interneurons locaux qui sont à la fois connectés pré-synaptiquement avec les ORN via des récepteurs au NMDA (**Golovin et al., 2019**) et post-synaptiquement avec les PN via des récepteurs au NMDA et GABAergiques (**Das et al., 2011**). L'activation prolongée de l'ORN par exposition à un odorant se traduit par l'excitation du LN qui inhibe alors ORN ou PN à qui il est connecté selon le glomérule considéré.

L'inhibition prolongée de l'ORN par le LN (inhibition rétroactive) déclenche la rétractation de l'axone de l'ORN et se caractérise par une diminution de la taille du glomérule après la période critique. A l'inverse, une inhibition du PN par le LN (inhibition antéro-active) déclenche une multiplication des fibres dendritiques du PN et se caractérise par une augmentation du volume glomérulaire (**Das et al., 2011**).

La LTH permettrait une réponse comportementale plus appropriée et durable aux stimuli éthologiques (**Devaud et al., 2003**) mais ne se traduirait cependant pas par une modification de la réponse électrophysiologique antennaire (**Devaud et al., 2001**), suggérant que le système olfactif périphérique ne serait pas impacté.

L'ensemble de ces mécanismes neuroanatomiques ne concernent cependant que des modifications structurelles et comportementales adaptées en réponse à des stimuli vécus par l'adulte. Une autre forme d'adaptation peut se former chez l'adulte en réponse à des stimuli vécus par l'individu au stade larvaire (**Gandolfi et al., 2003 ; Isingrini et al., 1985 ; Ray, 1999 ; Rietdorf & Steidle, 2002 ; Tully, Cambiazo, et al., 1994b**).

### ***Le Conditionnement pré-imaginal***

L'hypothèse d'un transfert de « mémoire » du stade larvaire au stade adulte chez un insecte a été proposée pour la première fois par **Hopkins (1917)** dans son Principe de Sélection d'Hôte (HSP) : il suppose en effet que l'expérience chimique reçue par la larve d'un insecte parasitoïde, élevée sur un hôte, peut être transmise à l'adulte et influencer le comportement de ponte de ce dernier.

Les premières tentatives de compréhension de ce phénomène peuvent se regrouper derrière l'hypothèse d'Héritage Chimique de **Corbet (1985)** selon laquelle un contaminant chimique de l'environnement larvaire se retrouverait dans/sur la cuticule de la puppe et influencerait le comportement de l'adulte pharate lors de son émergence. Il s'agirait donc plutôt d'une habitude induite par un composé issu de l'environnement larvaire se retrouvant dans l'environnement adulte que d'un réel conditionnement, le comportement généré étant en effet éteignable après quelques jours sans renforcements (**Jaenike, 1982 ; Thorpe, 1939**). Certaines limites de ces études sont de plus posées par **Jaenike (1983)**, qui leur reproche notamment de ne pas précisément différencier les effets d'une exposition larvaire et les effets d'une exposition adulte à un hôte sur l'acceptation de ce dernier par l'adulte (**Van Emden et al., 1996**).

**Ray (1999)** en injectant des tissus neuronaux de larves de *Musca domestica* conditionnées dans la tête de larves non conditionnées juste avant la pupaison montra la possibilité de « transférer » la réponse conditionnée et posa ainsi l'hypothèse que l'information contenue dans le SNC larvaire serait nécessaire au transfert de l'apprentissage au stade supérieur. Chez la Drosophile, **Tully et al., (1994)** a démontré un des premiers cas de transfert de conditionnement Pavlovien pré-imaginal entre larve et adulte. Dans leur étude, deux odeurs - dont une associée à un choc électrique - ont été présentées à des larves de Drosophile de 3<sup>ème</sup> stade. Il en a résulté un évitement conditionné de l'odeur associée au choc. L'évitement était toujours observable chez les adultes issus des larves conditionnées 8 jours après, et uniquement lorsque choc électrique et odeur étaient appariés (supprimant l'hypothèse d'un héritage chimique) (**Barron & Corbet, 1999**).

Des exemples de transfert de mémoire olfactive entre larve et adulte ont depuis été étudiés et mettent en œuvre diverses classes de composés. L'exposition pré-imaginale à une nourriture enrichie en acides gras (**Flaven-Pouchon et al., 2014**) ou en différentes espèces de levures (**Murgier et al., 2019**) se répercute en effet durablement sur le comportement adulte en modifiant ses préférences de ponte et d'alimentation.

Au commencement de ma thèse, une nouvelle forme d'imprégnation chez *D. melanogaster* venait d'être découverte dans notre laboratoire, mettant cette fois en œuvre le cVA (**Everaerts et al., 2018**).

En analysant des extraits d'œufs pondus par une même femelle à un jour et 10 jours après son accouplement avec un mâle, les auteurs ont montré une variabilité naturelle de l'exposition olfactive péri-natale des œufs à cette phéromone. La femelle pondreuse relargue en effet le cVA hérité du mâle pendant les jours suivant l'accouplement, imprégnant ainsi de phéromone ses premières pontes. En absence de réaccouplement, les œufs pondus à 10 jours ne sont plus recouverts de cVA et une fois adultes, seuls les mâles pondus à 1 jour (appelés J1 dans l'étude) rejettent efficacement une femelle vierge associée à du cVA (donc fictivement accouplée), contrairement aux mâles J10 qui acceptent la femelle et paradent.

Différentes expériences de lavages et traitements d'expositions pré-imaginale des œufs pondus ont permis d'identifier une période critique du cVA se situant entre 10 et 20h suivant la ponte. Cette période se situerait autour de la période d'éclosion des larves, probablement lorsqu'elles consomment le chorion de leur œuf.

Ce travail a ainsi mis en évidence l'existence d'une plasticité de la réponse phéromonale adulte, dépendante de l'environnement chimique larvaire. Cette plasticité n'avait jamais été prise en compte dans les travaux menés sur l'effet pléiotrope du cVA dans les communautés naturelles de *Drosophiles*.

## VII - But de la thèse

En prenant en compte cette dernière découverte, le but de ma thèse était donc

- Dans un premier temps, d'étudier **l'impact d'une imprégnation précoce (au stade larvaire) au cVA** sur un autre comportement de *Drosophila melanogaster* déclenché par la détection de ce composé : **l'attractivité à distance de nourritures marquées par des conspécifiques** et enrichies en infochimiques.
- Dans un second temps, d'étudier **la détection périphérique du cVA chez des individus imprégnés précocement à la phéromone.**

En se basant sur la variabilité naturelle d'exposition au cVA des œufs pondus par les femelles accouplées, 4 traitements d'exposition à la phéromone ont été générés chez les descendants : (i) non-manipulés, (ii) naturellement imprégnés, (iii) naturellement non-imprégnés et (iv) manuellement imprégnés.

Les individus mâles et femelles issus de ces traitements ont premièrement été soumis à un choix de nourritures en tunnel de vol permettant de mieux caractériser leur attraction à distance à la phéromone. Pour ce faire, les nourritures utilisées ont été préalablement mises en contact avec des *Drosophiles* (mâles, femelles *D. melanogaster* ou *D. simulans*) et ainsi marquées par l'ensemble des composés (phéromonaux ou non) constituant leur odeur.

Plusieurs prédictions pouvaient être formulées concernant les résultats de cette expérience, en se basant sur ceux de **Cazalé-Debat et al. (2019)**. Il était premièrement envisageable un dimorphisme sexuel du comportement d'attraction des mouches utilisées en vol, avec une plus grande sensibilité des femelles pour le cVA, des mâles pour les HC femelles et des deux sexes pour les HC mâles.

Un dimorphisme entre individus imprégnés ou non au cVA des deux sexes était de plus envisageable : en n'utilisant pas le cVA comme signal indiquant la présence de conspécifiques sur les nourritures préalablement manipulées, il était attendu une perte d'attraction des mâles et femelles non-imprégnés pour les nourritures marquées par des mâles *D. melanogaster* ou enrichie artificiellement en cVA. Concernant les individus manuellement imprégnés, il était attendu une reconnaissance du cVA donc un comportement à distance se rapprochant de celui des individus naturellement imprégnés (**Tableau 1**).

Les volatiles issus de ces composés ont ensuite été échantillonnés et identifiés afin de discriminer plus précisément les marquages de nourriture effectués.

Dans la dernière partie de ce travail, la réponse électrophysiologique antennaire (EAG) au cVA de mâles et femelles exposés (ou non) précocement à ce composé a été caractérisée.

Selon **Kurtovic et al., (2007)**, il était envisageable une absence de dimorphisme sexuel de la réponse antennaire adulte face au cVA.

En prenant en compte les différences de comportement entre individus imprégnés ou non observées par **Everaerts et al., 2018**, il était envisageable une modification de la détection de la phéromone suivant le traitement pré-imaginal des mouches testées.

**Tableau 1** Récapitulatifs des prédictions et résultats obtenus en tunnel de vol, en fonction du sexe et de l'imprégnation des mouches testées face à différents choix de nourriture. Voir Matériels et Méthodes pour descriptions des nourritures utilisées et mouches testées en vol.

		PF/PF		PF/Mcs		PF/Fcs		Mcs/Fcs		Fcs/Fcs+cVA		Msim/Fsim	
		Prédictions	Résultats (%/%)	Prédictions	Résultats (%/%)	Prédictions	Résultats (%/%)	Prédictions	Résultats (%/%)	Prédictions	Résultats (%/%)	Prédictions	Résultats (%/%)
Femelles	CS	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	50/50 ✗	PF=Fcs	50/50 ✓	Mcs>>Fcs	50/50 ✗	Fcs<Fcs+cVA	50/50 ✗	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J1	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	20/80 ✓	PF=Fcs	80/20 ✗	Mcs>>Fcs	50/50 ✗	Fcs<Fcs+cVA	20/80 ✓	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J5	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	50/50 ✗	PF=Fcs	50/50 ✓	Mcs>>Fcs	50/50 ✗	Fcs<Fcs+cVA	50/50 ✓	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J5+cVA	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	50/50 ✗	PF=Fcs	50/50 ✓	Mcs>>Fcs	50/50 ✗	Fcs<Fcs+cVA	20/80 ✓	Msim=Fsim	50/50 ✓
Mâles	CS	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	20/80 ✓	PF<<Fcs	50/50 ✗	Mcs<<Fcs	50/50 ✗	Fcs>Fcs+cVA	50/50 ✗	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J1	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	20/80 ✓	PF<<Fcs	50/50 ✗	Mcs<<Fcs	50/50 ✗	Fcs>Fcs+cVA	50/50 ✗	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J5	PF = PF	50/50 ✓	PF=Mcs	20/80 ✗	PF<<Fcs	50/50 ✗	Mcs<<Fcs	50/50 ✗	Fcs>Fcs+cVA	50/50 ✓	Msim=Fsim	50/50 ✓
	J5+cVA	PF = PF	50/50 ✓	PF<<Mcs	50/50 ✗	PF<<Fcs	50/50 ✗	Mcs<<Fcs	80/20 ✗	Fcs>Fcs+cVA	50/50 ✗	Msim=Fsim	80/20 ✗







**MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## Eleverages et prélèvement des individus

Dans mon étude, j'ai utilisé deux espèces de Drosophiles :

- *Drosophila melanogaster* Meigen est une espèce de Drosophile cosmopolite appartenant au sous-groupe *melanogaster*. La lignée utilisée, Canton-S (CS) est une lignée isogénique établie par Bridges à partir d'individus sauvages collectés à Canton (Ohio, USA) dans les années 1920 (**Stern, 1943**). Elle est depuis utilisée en laboratoire comme souche de référence (**Benzer, 1967**).
- *Drosophila simulans* Sturtevant est une espèce apparentée à *D. melanogaster* et appartenant aussi au sous-groupe *melanogaster*. Toutes deux sont sympatriques dans de nombreuses aires géographiques (**David & Bocquet, 1975**). Très similaires morphologiquement, seuls les mâles des deux espèces sont distinguables par la forme de leur épandrium i.e. tergites encadrant la plaque anale (**Markow & O'Grady, 2006; Rice et al., 2019**). Les accouplements entre les deux espèces ne produisent pas de descendance fertile (**Capy & Gibert, 2004; Carracedo et al., 1998**). J'ai utilisé cette espèce car elle ne présente pas de dimorphisme sexuel du profil cuticulaire, celui-ci étant de plus comparable à celui des mâles *D. melanogaster* (forts taux de 7T et faibles taux de 7,11HD et 7,11ND) (**Sharma et al., 2012**).

Les stocks de Drosophiles sont maintenus sur du milieu nutritif (quantité pour 1L : farine de maïs 66g, levure de bière 50g, agar 9g, antifongique ®Apex Tegosept 30ml, eau distillée complétée à 1L), avec un photocycle L : D = 12 : 12 (heure d'allumage : 8h), une humidité relative de  $65 \pm 5 \%$ , et une température de  $24 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Afin de produire en continu des individus vierges, j'ai constitué des « tubes de ponte » en réunissant dans des tubes en verre de 30 ml contenant 10 ml de nourriture, cinq mâles et cinq femelles adultes transférés dans de nouveaux tubes de ponte tous les 2 jours. Après avoir été vidés des adultes, les tubes de ponte sont conservés jusqu'à l'émergence des descendants vierges qui sont alors triés pour les expériences sous anesthésie légère au CO<sub>2</sub>.

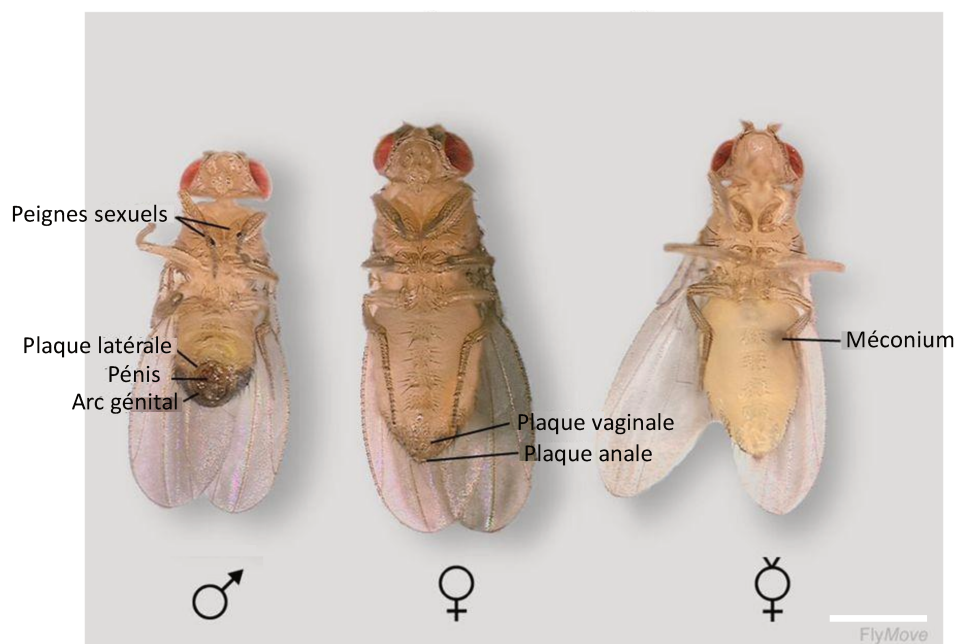
Les mouches ténérales (individus nouvellement émergés dont la cuticule n'est pas encore tannée, au corps mou et non coloré) sont collectées quotidiennement de 8h à 10h (**Markow & O'Grady, 2006**). La présence d'un méconium (tâche sombre présente sur l'abdomen correspondant à des matières fécales non-évacuées pendant la pupation) garantit que les mouches récoltées ont émergé récemment (moins de 6h).

Les femelles n'étant pas réceptives aux mâles avant leur 8<sup>ème</sup> heure post – émergence, le méconium est un moyen fiable garantissant la virginité des individus collectés (**Pulver & Berni, 2012**), état confirmé par l'absence d'œufs dans les tubes où sont placées les femelles jusqu'à leur utilisation.

Les individus vierges sont séparés par sexe (**Figure 8**) et groupés selon différentes densités en fonction de leur future utilisation :

- Les mâles utilisés en comportement sont isolés afin de limiter leur exposition aux signaux émis par d'autres mâles et ainsi ne pas affecter leur comportement ultérieur (**Svetec & Ferveur, 2004**).
- Les femelles utilisées en comportement sont groupées par 10.
- Les mâles et femelles qui sont utilisés comme géniteurs lors de la réalisation des traitements d'exposition sont groupés par 5.
- Les mâles et femelles utilisés pour marquer le milieu utilisé en tunnel de vol sont groupés par 20.

Les individus qui émergent le week-end sont conservés pour créer de nouveaux tubes de ponte afin de maintenir les stocks.



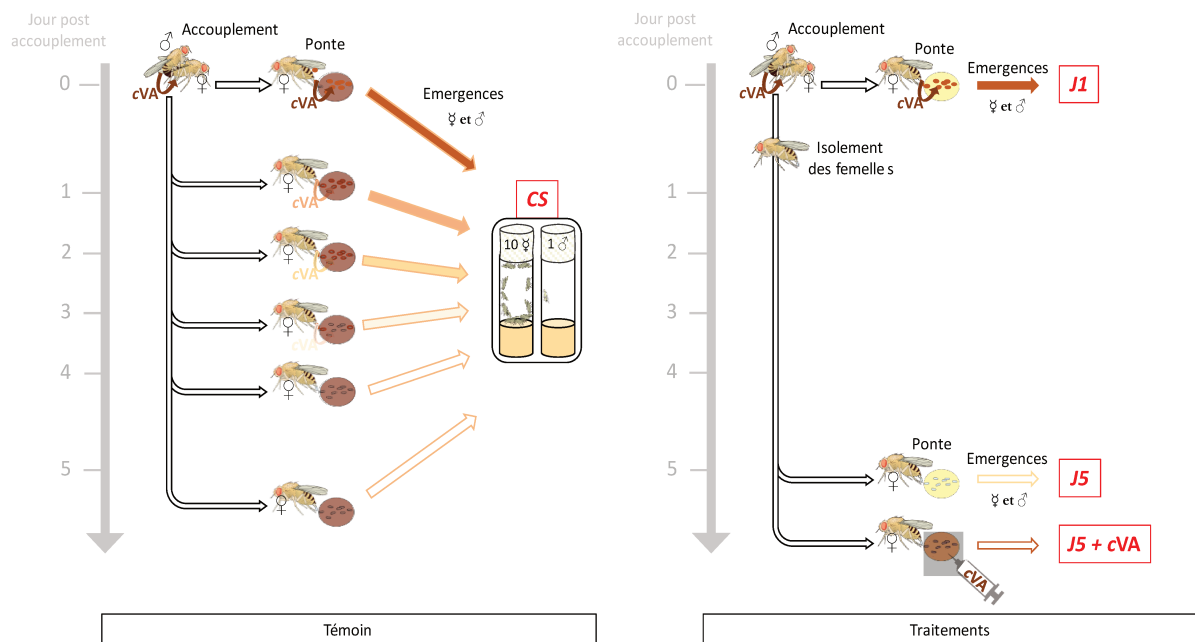
**Figure 8** - Principaux caractères dimorphiques chez *Drosophila melanogaster* permettant la discrimination des deux sexes et des mouches récemment émergées lors du tri des individus. (Source : **FlyMove**, Echelle : 0.75 mm)

## Traitements pré-imaginaux et imprégnation au cVA

Le but est d'étudier l'effet d'une exposition larvaire au cVA sur la réponse comportementale et électrophysiologique de *Drosophiles* adultes. Pour ce faire, j'ai utilisé des *Drosophiles* issues de 3 traitements différents (**Figure 9**). Pour les réaliser, 5 mâles et 5 femelles vierges âgés de 3 jours sont réunis durant 24h sur de la nourriture standard afin de permettre à la fois leur accouplement et la ponte.

- Pour le premier traitement, les mâles et femelles sont éliminés à la fin des 24h et les tubes conservés jusqu'à émergence des descendants adultes (dénommés par la suite **J1**). Dans ce cas, les œufs pondus ont donc été en contact avec les HC de la femelle et, en moindre quantité, du mâle (7,11 ND, 7,11 HD et 7T - transférés passivement du mâle à la femelle lors de l'accouplement - **Farine et al., 2012**) et en contact avec le cVA et le microbiote transmis par le mâle à la femelle (**Bakula, 1969 ; Everaerts et al., 2018 ; Narasimha et al., 2019**).
- Pour le deuxième traitement, seuls les mâles sont éliminés après la période d'accouplement. Les femelles sont conservées pendant 4 jours puis mises à pondre au 5<sup>ème</sup> jour dans de nouveaux tubes. **Everaerts et al., (2018)** ont démontré que le cVA transféré par le mâle à la femelle pendant l'accouplement est évacué des voies génitales de celle-ci et déposé sur les œufs lors des premiers jours de pontes. En transférant les femelles pondeuses dans un nouveau tube de nourriture standard au 5<sup>ème</sup> jour après l'accouplement, je m'assure que les individus issus de ce tube ne sont pas exposés au cVA, et vraisemblablement pas non plus au microbiote du mâle (les adultes issus de ce traitement sont dénommés **J5** par la suite).
- Pour le troisième traitement, la procédure utilisée est identique à la précédente, si ce n'est qu'au 5<sup>ème</sup> jour, les femelles accouplées sont transférées dans des tubes de nourriture standard enrichie par 15 ng/ mm<sup>3</sup> de cVA (**J5+cVA**) (@Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA ; 50 mg/ml solution in ethanol ; purity > 98%) (**Cazalé-Debat et al., 2019 ; Everaerts et al., 2018**). Dans ce cas, les œufs (et larves en émergeant) ont donc été en contact avec du cVA, mais pas avec le microbiote du mâle.

- En parallèle, j'utilise un groupe témoin (**CS**) obtenu en récoltant dans l'élevage de masse des mâles et femelles vierges. Ce lot permet de tester des individus dont l'environnement larvaire n'a pas été manipulé et qui ont donc grandi aux contacts de tous les signaux chimiques présents dans les conditions contrôles. Les adultes étant renouvelés toutes les semaines, les individus récoltés sont pondus entre 1 et 5 jours après l'accouplement.



**Figure 9** - Protocole permettant l'obtention de descendants issus des 4 traitements pré-imaginaux **CS**, **J1**, **J5** et **J5 + cVA**. Les descendants vierges des femelles accouplées des élevages de masse sont récupérés et constituent le lot contrôle **CS**. En parallèle, les femelles *D. melanogaster* accouplées sont mises à pondre le jour de leur accouplement (donnant des descendants **J1**) ou 5 jours après sur de la nourriture standard (donnant des descendants **J5**) ou enrichie par 15 ng/ mm<sup>3</sup> de cVA (donnant des descendants **J5 + cVA**). Pour tous les traitements pré-imaginaux, (CS, J1, J5, J5+cVA), tous les descendants ont été récupérés vierges et maintenus seuls pour les mâles ou par groupe de 10 pour les femelles. La couleur des flèches indique la dose et la provenance du cVA perçu par les descendants (rouge : forte teneur en cVA, jaune : cVA absent, intérieur coloré : cVA transmis par la mère, contour coloré : cVA présent dans la nourriture).

Les réponses comportementales et électrophysiologiques de ces individus ont été étudiées en tunnel de vol et par enregistrements électroantennographiques (EAG).

## Tunnel de vol

Le tunnel de vol a été utilisé afin d'étudier l'attraction à distance de Drosophiles, issues des traitements pré-imaginaux, par différents milieux. Il s'agit d'une enceinte permettant d'observer la dynamique et la prise de décision de Drosophiles en vol libre, testées seules ou groupées (**Becher et al., 2010 ; Jang et al., 1994**).

Notre dispositif (Engineering Laboratory Design®, Lake City, MN, USA) est un tunnel parallélépipédique en panneaux acryliques transparents (155 x 30,5 x 30,5 cm) permettant l'observation des sujets. Il est doté en amont d'une entrée d'air (séparée par 3 filtres métalliques de maillages respectifs 1 cm<sup>2</sup>, 1 mm<sup>2</sup> et 1 mm<sup>2</sup>) et en aval d'une pompe aspirante (®Aerovent CBD, 460 V, 60 Hz et séparé par un dernier filtre métallique de 1 mm<sup>2</sup> de maillage), l'ensemble générant un flux d'air laminaire de 0,4 m/s. La zone d'observation comporte une plateforme de décollage (h = 16 cm, Ø = 2 cm) située exactement entre les parois latérales et à 120 cm de l'entrée d'air ainsi que deux plateformes de choix (h = 16 cm, Ø = 5,3 cm) situées à 90 cm en aval de la plateforme de décollage, espacées l'une de l'autre de 7,5 cm et de 11,5 cm de la paroi latérale correspondante (**Figure 10 – B et C**).

L'intérieur du tunnel est illuminé par des LEDs blanches (BDL-F300W-05-3528, 1 m, 24 W) recouvertes d'un papier permettant d'homogénéiser l'éclairage dans la zone d'observation et d'un filtre rouge réduisant les stimulations visuelles (**Sharkey et al., 2020**). En outre, les parois latérales du tunnel sont ornées d'un motif aléatoire de carrés noirs et blanc (3 cm de côté) limitant l'impact des indices visuels dans l'orientation des mouches (**Houot et al., 2017**) (**Figure 10 – A et B**). L'humidité relative du tunnel et la température sont respectivement maintenues à 60 ± 5 % et 25 ± 1 °C.

J'ai utilisé le tunnel de vol afin d'analyser l'attraction à distance et le choix d'une Drosophile face à deux milieux vierges témoins (a), un milieu vierge et un milieu marqué (b) ou deux milieux marqués (c) (**Tableau 2**).

La veille du test, afin d'amplifier leur réponse, les mouches sujets sont mises à jeûner individuellement pendant 15h dans des tubes contenant un morceau de coton humidifié (**Becher et al., 2010**). Les observations sont effectuées de 9h à 16h. Le sujet est introduit pendant 3 à 5 min dans une chambre d'acclimatation accolée au tunnel. Celle-ci est séparée par une cloison mobile qui est, par la suite, levée afin de laisser l'insecte accéder à l'intérieur du tunnel. Le temps initial correspond à

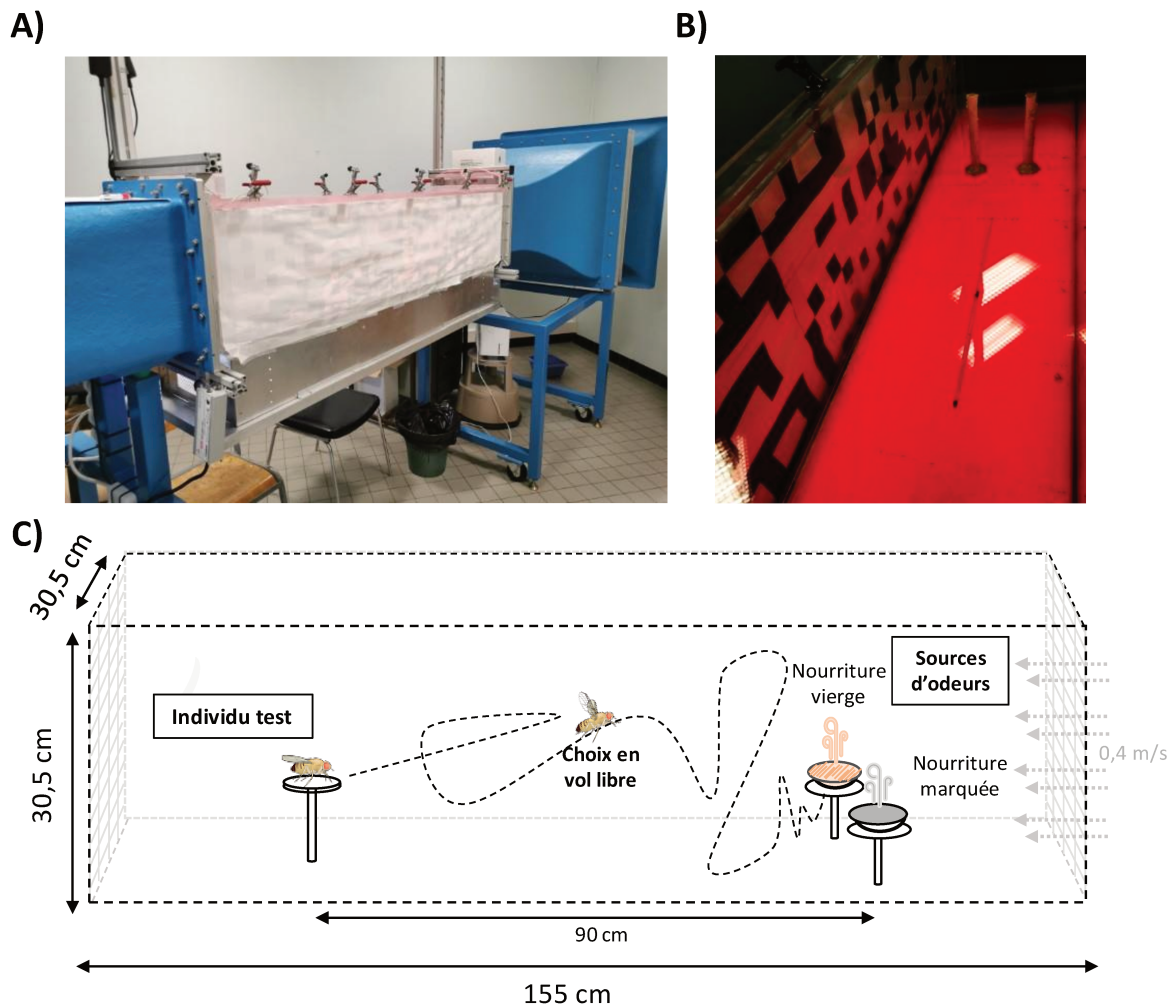


l'accès de la mouche sur la plateforme de décollage, et le temps final correspond au temps de l'atterrissage de la mouche sur une des nourritures proposées ou à 10 min d'observation selon le cas (**Figure 10 – C**).

Après chaque test, le sujet est retiré à l'aide d'un aspirateur à bouche en soulevant la plaque supérieure de plexiglas puis éliminé. La position des deux milieux est intervertie afin de limiter l'existence possible de biais d'asymétrie dans le choix effectué par les futures mouches testées. Les milieux sont renouvelés après 6 répétitions, permettant ainsi de fournir de la nourriture fraîche toutes les heures. L'ouverture régulière du tunnel permet de plus de l'aérer régulièrement.

La *latence de décollage* et, le cas échéant, le *temps pour atteindre une des deux nourritures proposées* ainsi que les *fréquences de décollage, d'atterrissage et de choix* sont les paramètres enregistrés et calculés pendant mes observations.

A la fin de la journée de tests, l'ensemble du tunnel est nettoyé à l'éthanol pur.



**Figure 10** – Dispositif de tunnel de vol. Vue **A)** de l'extérieur et **B)** de l'intérieur du tunnel. **C)** Schématisation du vol d'une *Drosophile*, les sources d'odeurs pouvant être deux nourritures vierges, une nourriture vierge face à une nourriture marquée ou deux nourritures marquées.

### Marquages des nourritures

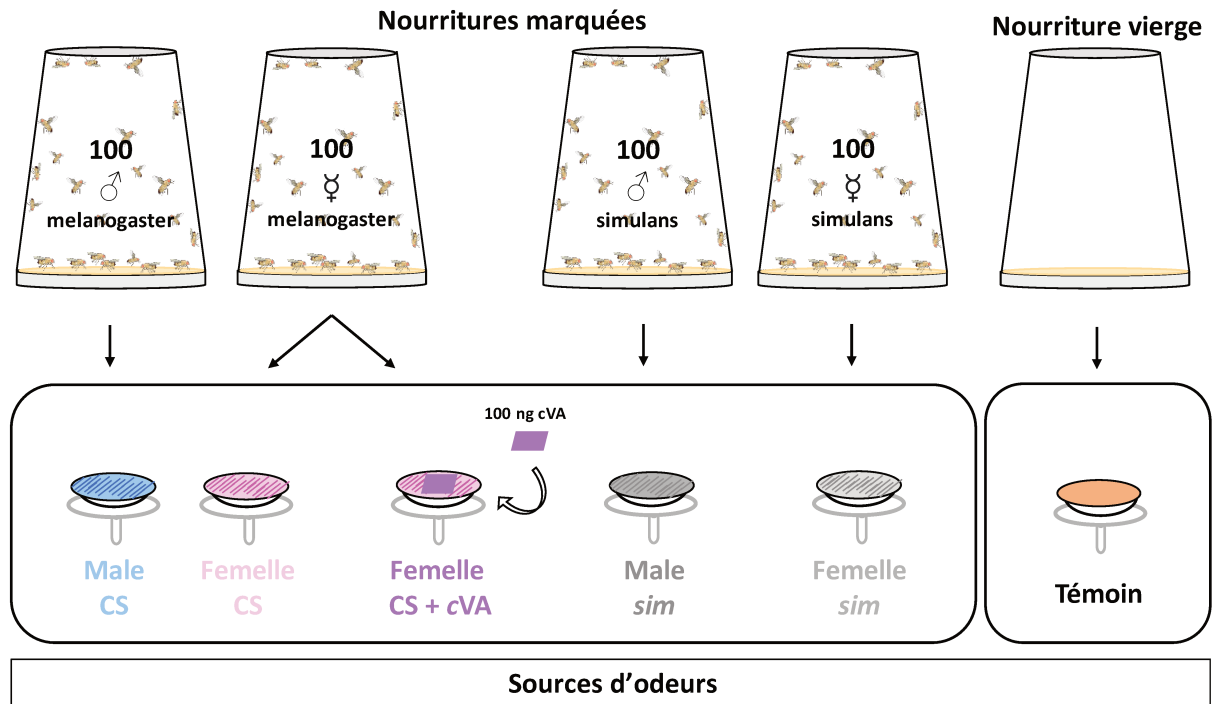
Afin de marquer les milieux testés, des groupes de 100 individus vierges âgés de 3 à 7 jours sont mis en contact avec 20g de nourriture fraîche dans des boîtes de Pétri ( $\varnothing = 5.3$  cm,  $h = 1.2$  cm) recouvertes d'un couvercle perforé. Le marquage est effectué pendant 15h dans les conditions d'élevage habituelles (12:12 heures cycle L/D, HR  $65 \pm 5$  %,  $24 \pm 0.5$  °C) avant de les tester en tunnel de vol. Les individus peuvent ainsi déposer leurs fèces et microbiotes sur la nourriture, les méthyl-laurate, -palmitate et -myristate d'origine encore non-identifiée et les composés microbiotiques (produits de dégradation des levures et bactéries) (**Bakula, 1969; Keeseey et al., 2016; Mercier et al., 2018**). D'autre part, ils déposent des HC par simple transfert sur le milieu lors

de leurs déplacements (**Farine et al., 2012**). Ces différents infochimiques représentent ainsi des signaux spécifiques du sexe et de l'espèce, et, en marquant le milieu, peuvent donc jouer un rôle crucial dans l'agrégation, l'alimentation et autres comportements des Drosophiles (**Keesey et al., 2016**).

Cinq types de marquages et un témoin sont ainsi réalisés (**Figure 11**) :

- Marquage **mâle CS** (dénommé *Mâle CS* par la suite),
- Marquage **femelle CS** (*Fem CS*),
- Marquage **femelle CS additionné de cVA** (*Fem CS+cVA*) réalisé en déposant 100 ng de cVA (dilué dans de l'hexane - 99% de pureté, Sigma-Aldrich) sur un papier filtre (5 mm x 5 mm) qui est ensuite déposé sur la nourriture marquée par des femelles quelques minutes avant les tests,
- Marquage **mâle simulans** (*Mâle sim*),
- Marquage **femelle simulans** (*Fem sim*),
- Un **témoin** (*plain food - PF*) est réalisé en plaçant de la nourriture standard sans aucun marquage dans les mêmes conditions d'élevage.

Ces différents marquages ont été proposés par paires à des femelles et mâles issus des traitements pré-imaginaux (CS, J1, J5 et J5+cVA) (**Tableau 22**).



**Figure 11** - Processus d’obtention des nourritures marquées par des *Drosophiles*, ou du témoin vierge, utilisés lors des tests de choix en tunnel de vol.

**Tableau 2** Effectifs de *Drosophiles melanogaster* issus des 4 traitements pré-imaginaux et testés en tunnel de vol face aux choix de nourritures (marquées ou non) indiqués en première colonne

	Femelles					Mâles				
	CS	J1	J5	J5+cVA	Total	CS	J1	J5	J5+cVA	Total
Témoin / Témoin	80	69	56	64	<b>269</b>	72	50	49	49	<b>220</b>
Mâle CS / Témoin	51	130	37	43	<b>261</b>	45	113	34	38	<b>230</b>
Femelle CS / Témoin	49	56	70	61	<b>236</b>	61	55	51	58	<b>225</b>
Femelle CS / Femelle CS +cVA	41	111	100	106	<b>358</b>	31	98	91	88	<b>312</b>
Mâle CS / Femelle CS	49	59	41	45	<b>194</b>	46	51	46	41	<b>184</b>
Mâle <i>simulans</i> / Femelle <i>simulans</i>	55	55	47	42	<b>199</b>	44	53	38	39	<b>174</b>

## **Analyses chimiques des composés volatils émis par les nourritures marquées**

Le but est d'étudier les composés volatils odorants émanant des différents milieux utilisés en tunnel de vol (marqués ou non). Pour ce faire, j'ai réalisé des micro-extractions en phase solide (SPME) de l'air contenu dans un flacon étanche contenant les différents milieux décrits ci-dessous. Les composés présents dans l'air situé entre les milieux et l'opercule (i.e. espace de tête) sont adsorbés sur la fibre SPME puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (**Figure 12**).

Douze types d'extraits ont été réalisés et analysés :

- i.** Nourriture vierge,
- ii.** Mâles *melanogaster*,
- iii.** Femelles *melanogaster*,
- iv.** Mâles *melanogaster* + nourriture,
- v.** Femelles *melanogaster* + nourriture,
- vi.** Mâles simulans,
- vii.** Femelles simulans,
- viii.** Mâles simulans + nourriture,
- ix.** Femelles simulans + nourriture,
- x.** 100 ng de cVA sur papier filtre (1cm<sup>2</sup>),
- xi.** 100 ng de cVA sur papier filtre (1cm<sup>2</sup>) + nourriture,
- xii.** 1 µl de solution stock de cVA à 50 mg/ml dilué dans de l'éthanol (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA, pureté > 98%).

Pour chaque condition,  $3 \leq n \leq 4$ , sauf pour la dernière qui n'est réalisée qu'une seule fois car a pour but de localiser et identifier le cVA. Un blanc (sans nourriture ni individus) a été répété tous les jours d'expérimentation afin de s'assurer de la propreté des flacons, de la fibre et de la colonne de chromatographie.

Le marquage est effectué 15h avant les extractions : 25 individus sont introduits dans des flacons vides (conditions **ii**, **iii**, **vi** et **vii**) ou dans des flacons contenant 5g de nourriture placée 3 jours au préalable et stockés à 4 °C (conditions **iv**, **v**, **viii** et **ix**).

Pendant la période de marquage, les flacons sont placés dans les conditions d'élevage habituelles, si ce n'est que les bouchons sont remplacés par une mousseline en coton afin d'éliminer toute humidité excessive.

Le nombre d'individus et la quantité de nourriture introduits dans les flacons (25 individus pour 5 g) sont déterminés afin de conserver le même ratio « nombre d'individus / quantité de nourriture » que les milieux utilisés en tunnel de vol (i.e. 100 individus pour 20 g).

Le jour de l'échantillonnage, les individus des conditions **(ii)** à **(ix)** sont éliminés et les mousselines remplacées par des bouchons hermétiques munis d'un septum en téflon. Les conditions **(x)** et **(xi)** sont réalisées en parallèle en déposant 10 µl d'une solution à 10 ng/µl de cVA dilué dans de l'hexane (99% de pureté, Sigma-Aldrich) sur un papier filtre (1 cm<sup>2</sup>) quelques minutes avant de les introduire dans des flacons vides ou contenant 5 g de nourriture. Tous les flacons sont ensuite placés à 26°C au minimum 1h avant les extractions. Cette étape a pour but de saturer l'espace de tête en composés odorants après l'élimination des mouches.

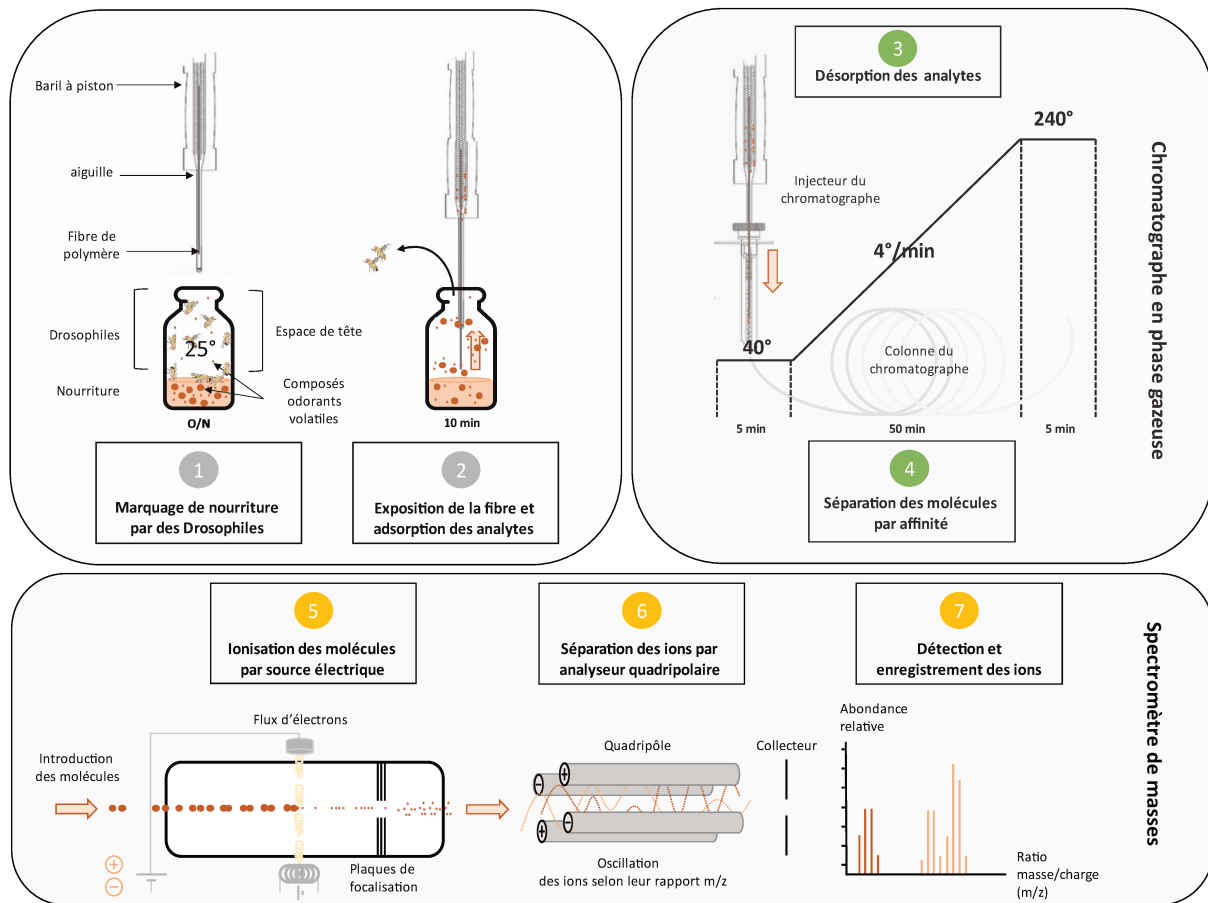
L'insertion au travers du septum d'une fibre SPME triphasique (Divinylbenzene DVB / Carboxen CAR / Polydiméthylsiloxane PDMS, couches CAR-PDMS de 30 µm - couche DVB de 50 µm ; ®SUPELCO) permet l'adsorption de ces odorants pendant 10 min à température ambiante. Avant chaque échantillonnage, la fibre est conditionnée 30 min à 270°C.

Les analyses en GC – MS sont réalisées grâce à un chromatographe Agilent 6890A couplé à un spectromètre de masse quadripôles MSD 5973 Network fonctionnant en mode d'ionisation électrique et détectant les ions de 29 à 350 m/z. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire DB-Wax (longueur : 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur du film 0,050 µm ; Agilent® J&W) et d'un port d'injection SPME fonctionnant en mode *splitless* (càd. la totalité de l'échantillon injecté est dirigé vers la colonne) à 240°C. Pour la condition **(xii)**, un insert de port d'injection acceptant les liquides est utilisé. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,5 ml/min.

La température du chromatographe est programmée comme suit : la température initiale du four est maintenue à 40°C pendant 5 min, puis augmente graduellement jusqu'à 240°C à 4°C/min et est enfin maintenue durant 5 min à 240°C. Le temps total d'analyse est ainsi de 60 min. La fibre SPME est laissée dans

l'injecteur 15 min afin de s'assurer de la désorption totale des composés volatiles adsorbés.

L'identification des composés détectés a été faite au moyen du logiciel GC-MS *data analysis* couplé aux bases de données *Wiley* et *Inramass*. Tous les composés comprenant des dérivés siliconés issus de la colonne de silice ( $m/z = 73, 147, 207, 221, 281, 355$ ) (**Timko et al., 2009**), dont l'identification n'est pas assurée (probabilité < 10 %), qui sont aussi présents dans le témoin vide ou qui ne se retrouvent pas dans au moins 2 réplicas d'une même condition, sont écartés.



**Figure 12** - Dispositif d'analyse d'espace de tête des nourritures marquées. Récapitulatif des étapes principales d'émission (1), adsorption (2), désorption (3), séparation en GC (4), ionisation (5), séparation en MS (6) et identification des composés volatiles (7) générés par les Drosophiles et par la nourriture marquée ou non. Flèches rose : sens de migration des analytes captés par la fibre SPME

## Electroantennographie (EAG)

Les réponses antennaires au cVA de mâles et femelles vierges CS, J1, J5 et J5+cVA âgés de 3 à 7 jours (n=15 pour chaque traitements) ont été comparées par enregistrements électrophysiologiques.

Les électrodes de référence et d'enregistrement sont obtenues par étirement de capillaires en verre borosilicate (diamètre externe : 1.2 mm, diamètre interne : 0.69 mm, longueur : 102 mm, World Precision Instruments®, Sarasota, FL, USA) grâce à une étireuse P-97 Flaming/Brown™ micropipette puller (Sutter instrument®) programmée comme suit (**Miller et al., 2002**) (**Tableau 33**).

**Tableau 3** Programme d'étirement des capillaires en verre nécessaires aux enregistrements électrophysiologiques antennaires sur Drosophiles. Le même programme est utilisé pour l'obtention des capillaires de référence et d'enregistrement.

	Chaleur (U)	Traction (U)	Vitesse (U)	Temps (U)
<b>Etape 1</b>	393	30	25	200
<b>Etape 2</b>	393	30	25	200
<b>Etape 3</b>	393	0	55	200
<b>Etape 4</b>	393	50	75	200
Souffle d'air refroidissant au début et à la fin de l'étirement de 5 sec				
Pression du souffle d'air refroidissant fixé à 500 U				

Les électrodes ainsi obtenues (2.8 µm de diamètre interne) sont ensuite remplies d'une solution saline conductrice pour insecte (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hépès buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich), (pH 7.2, stockée à 4°C) (**Chertemps et al., 2012**).

Les individus testés sont immobilisés dans un cône de pipette de 200 µl (Eppendorf™) tronqué à l'extrémité apicale laissant accessibles leurs yeux et antennes (**Figure 13 - A**). L'électrode de référence est introduite dans l'œil gauche de l'individu et l'électrode d'enregistrement est apposée à la région antérieure distale du troisième segment antennaire controlatéral (**Figure 13 - B**).

Afin d'éviter un dessèchement des antennes pendant la présentation des odeurs, un flux d'air humide (1L/min) généré par une pompe (Wisa®) est acheminé par un tube



en téflon placé à 1 cm de l'individu et souffle continuellement sur celui-ci (**Figure 13 - D**).

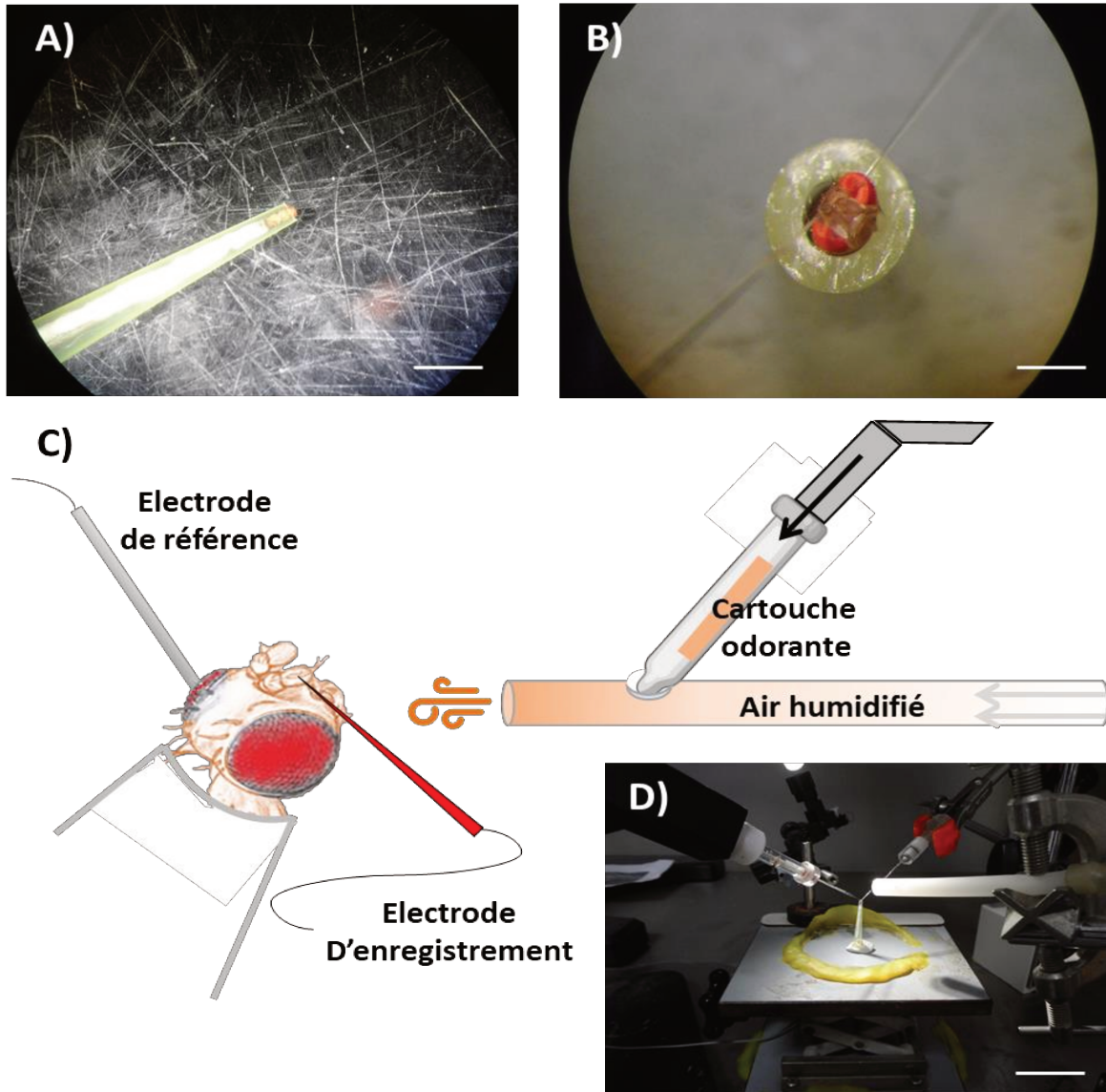
Les composés à analyser sont déposés sur des languettes de papier filtre (2 cm x 3 mm, Whatman®) contenues dans des pipettes Pasteur. Ces pipettes sont raccordées par leur extrémité la plus large à une électrovanne (Kuhnke®) contrôlée électroniquement (PDES-02DX, NPI Electronics®) permettant de délivrer des bouffées d'air de 200 ms. Pendant l'enregistrement, l'extrémité effilée de la pipette est insérée dans le tube en téflon afin de délivrer l'odeur qu'elle contient dans le flux d'air humide projeté sur l'antenne (**Figure 13 - C et D**).

Les antennes sont ainsi stimulées par

- (i) 10 µl d'hexan-1-ol (Sigma-Aldrich, 10<sup>-1</sup> M) et d'heptan-2-one (Sigma-Aldrich, 10<sup>-1</sup> M) dilués dans de l'huile de paraffine comme contrôle du branchement électrique de l'individu testé (**Chertemps et al., 2012**) ;
- (ii) 10 µl d'huile de paraffine puis d'hexane pur (99%, Sigma-Aldrich) comme contrôles négatifs ;
- (iii) 10 µl d'une gamme de cVA (1, 100, 300 and 500 µg/papier filtre) dilués dans de l'hexane et présentée dans l'ordre croissant des doses ;
- (iv) 10 µl d'hexan-1-ol final afin de s'assurer de la survie de la Drosophile, de la constance de sa réponse électrophysiologique et de la stabilité du branchement pendant l'enregistrement.

Le signal enregistré est amplifié (x5) et filtré par un filtre passe-bas (atténuant les fréquences supérieures à 0,5 KHz) au moyen d'un amplificateur AxoPatch 2008 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) avant d'être numérisé à une fréquence de 1 KHz par une carte d'acquisition Digidata 1440A (Molecular devices). L'acquisition et les analyses sont respectivement menées grâce aux logiciels Axoscope® (Axon™pCLAMP™ 11.1, Molecular devices) et Clampfit® (Molecular devices).

L'amplitude de dépolarisation (mV) ainsi que la vitesse de repolarisation (mV/ms) des antennes après chaque stimulation sont enregistrées et ont fait l'objet d'une comparaison entre traitements d'exposition.



**Figure 13** – Dispositif d'électroantennographie sur *D. melanogaster*. Vue sous loupe binoculaire A) d'une Drosophile immobilisée à l'extrémité apicale d'un cône de pipette (échelle 2 mm) et B) connectée au système d'électroantennographie au moyen des deux électrodes de référence et d'enregistrement (échelle 0.5 mm). C) Représentation schématique du dispositif de présentation des odeurs aux Drosophiles par électrovanne. D) Vue d'ensemble des positions et tailles relatives du cône de pipette contenant la Drosophile, des capillaires connectant la Drosophile et du tube en téflon acheminant les odeurs (échelle 2 cm).

### **Analyses statistiques**

Les tests statistiques ont été menés au moyen du logiciel XLstat PREMIUM (Addinsoft ; version 2021.5.1.1220)

Les fréquences de décollage, d'atterrissage et de choix enregistrées en tunnel de vol ont été analysées par sexes et par nourritures proposées au moyen d'un test de rapport de vraisemblances ( $G^2$  de Wilks) sur tableau de contingence. Les préférences de nourritures ont été analysées par test  $Z$  bilatéral afin de tester l'égalité entre deux proportions puis comparées entre-elles par procédure de Marascuilo en test *post-hoc* (**Wagh & Razvi, 2016**). Afin d'étudier l'impact de l'imprégnation sur les latences d'envol et le temps mis par les mouches pour se poser sur une des plateformes de nourritures marquées ou vierges, ces durées ont d'abord été comparées entre imprégnations par un test de Kruskal-Wallis complété par une procédure *post-hoc* de Dunn avec correction de Bonferroni. Les durées ont ensuite été comparées par nourriture au sein d'une même imprégnation par test  $U$  de Mann-Whitney.

Les quantités absolues des composés détectés en chromatographie gazeuse lors des analyses d'espace de tête - hormis ceux présents également dans les témoins - ont été utilisées pour réaliser une Analyse en Composantes Principales (ACP) avec une sélection des variables pertinentes par une procédure de Kaiser - Meyer - Olkin (KMO ; critère  $KMO > 0,5$  - **Dziuban & Shirkey, 1974**). Vu les faibles effectifs, les ACP ont été réalisées en utilisant les moyennes des quantités des différents composés pour chaque type d'échantillon envisagé. Trois ACP ont été réalisées : la première sur les échantillons correspondant aux mouches en absence de nourriture et au flacon vide, utilisé comme contrôle. La deuxième, à ceux correspondant aux mouches en présence de nourriture et à la nourriture seule utilisée comme contrôle. Enfin, une ACP "globale" regroupant les échantillons avec et sans nourriture a été réalisée afin d'illustrer l'ensemble des données.

Les amplitudes de réponses et les temps de repolarisation des antennes ont fait l'objet d'une première comparaison par sexes et par doses entre imprégnation au moyen d'un test de Kruskal-Wallis complété par une comparaison *post-hoc* de Dunn (avec correction de Bonferroni). Ces variables ont ensuite servi de variables quantitatives dans une Analyse Factorielle Discriminante (AFD) qui utilise l'imprégnation comme variable qualitative.

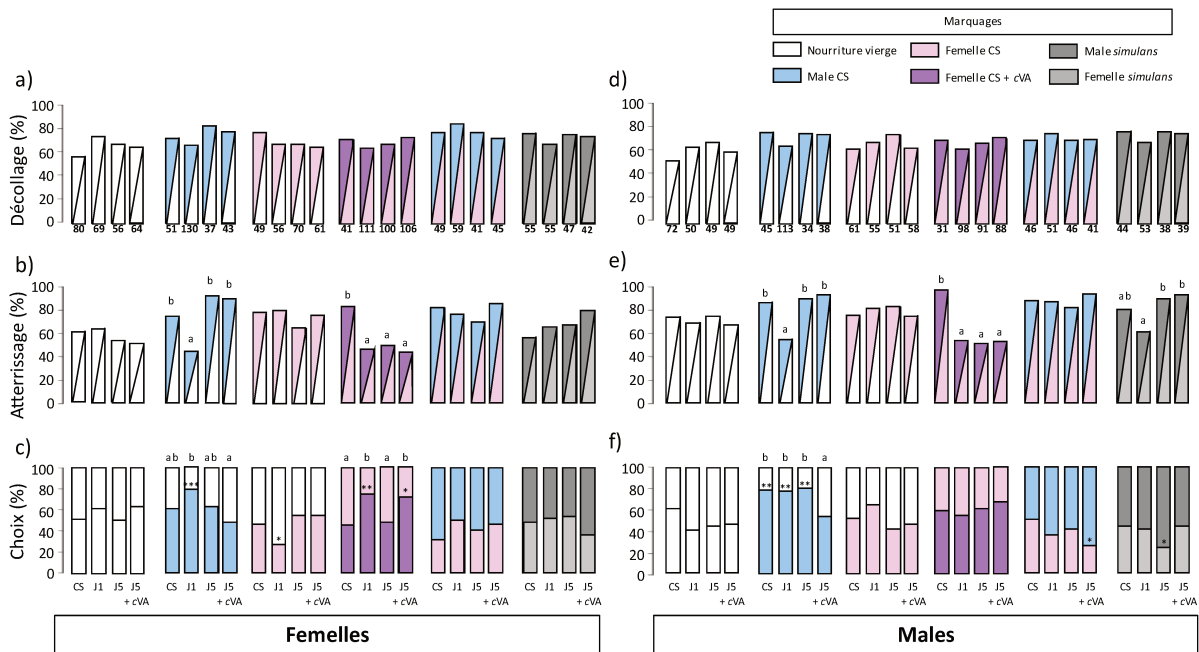






## Tunnel de vol

Le tunnel de vol m'a permis d'étudier l'attraction à distance et la prise de décision en vol libre de *D. melanogaster* femelles et mâles issus des 4 traitements pré-imaginaux (CS, J1, J5 et J5 + cVA) auxquels j'ai présenté un choix entre 2 nourritures standards et/ou marquées. Dans ce dernier cas, le marquage était effectué au moyen de mâles ou de femelles hétérospécifiques (*D. simulans*) ou homospécifiques. Ces marquages ont été complétés en effectuant un marquage par des femelles *D. melanogaster* et enrichie par du cVA synthétique (100 ng).



**Figure 14** – Pourcentages d’envols (**a** et **d**), d’atterrissages (**b** et **e**) et de choix de nourritures marquées (**c** et **f**) des femelles et mâles *D. melanogaster* observés en tunnel de vol. Les effectifs totaux de mouches utilisés sont indiqués à la base des graphiques **a** et **d** et leur expérience pré-imaginale à la base des graphiques **c** et **f**. Les graphiques **b** et **e** sont calculés indépendamment du choix et à partir du nombre d’individus s’étant envolés. Pour l’ensemble des graphiques, le code couleur indique le type de marquage de nourritures effectué en amont de l’expérience.

6 choix de nourritures ont ainsi été effectués : (i) le premier, témoin, oppose deux nourritures vierges ; (ii) et (iii) opposent une nourriture marquée par mâle ou femelles CS à une nourriture vierge ; (iv) et (v) opposent une nourriture femelle CS à une nourriture femelle enrichie de 100 ng de cVA ou à une nourriture mâle CS et enfin (vi) oppose une nourriture mâle *simulans* à une nourriture femelle *simulans*.

Des lettres différentes indiquent des différences significatives ( $\alpha = 0.05$ ) : a est différent de b mais ab n’est ni différent d’a ni de b. Les astérisques indiquent des niveaux de significativité différents (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

### Fréquences d'envol

Quels que soient les choix proposés ou l'expérience préalable des sujets, les fréquences d'envol sont comprises entre 53% et 80% chez les mâles et 56% et 84% chez les femelles. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les différents traitements pré-imaginaires, quel que soit le choix de nourriture proposé (**Figure 14 – a et d**).

Toutefois il faut noter qu'à part pour le choix *Fem CS/PF*, les fréquences de décollage face à chacun des choix proposés varient de manière comparable entre les différents traitements pré-imaginaires. Lorsqu'ils sont testés face à 2 sources *PF/PF*, les sujets (des 2 sexes) témoins (CS) décollent moins que les sujets traités (J1, J5 et J5+cVA) : 56 % vs. 65-75% pour les femelles et 53% vs. 61-69% chez les mâles. Face aux choix *Mâle CS/PF*, *Fem CS/Fem CS + cVA*, et *Mâle sim/Fem sim*, ce sont les sujets J1 qui décollent le moins fréquemment (69, 66 et 66% pour les sujets femelles, et 68, 61 et 67% pour les mâles), alors que face au choix entre *Mâle CS/Fem CS*, ce sont ces mêmes sujets J1 qui décollent le plus (respectivement, 86% et 77% pour les sujets femelles et mâles). Dans le cas du choix *Fem CS/PF*, alors que pour les sujets femelles ce sont les témoins (CS) qui décollent le plus (80%), ce sont les sujets J5 qui décollent le plus pour les mâles (77%).

### Fréquences d'atterrissage

Contrairement aux fréquences de décollage, les fréquences d'atterrissage peuvent varier significativement selon le choix proposé, le sexe du sujet et son expérience préalable (**Figure 14 – b et e**).

Chez les mouches sujets des 2 sexes, les fréquences d'atterrissage ne présentent pas de différences significatives en fonction de l'expérience face à 2 sources *PF/PF*, ou face au choix *Fem CS/PF* et *Mâle CS/Fem CS*. Cependant dans le second cas, les fréquences varient de façon similaire en fonction de l'expérience chez les 2 sexes (pour les femelles et les mâles, respectivement, en ordre croissant : J5 : 69 & 82%, J1 : 75 & 87%, CS : 82 & 88% et J5+cVA : 85 & 93%).

Le choix *Mâle CS/PF*, déclenche la même variation significative de fréquence en fonction de l'expérience dans les 2 sexes : la fréquence observée pour les sujets J1 (femelles : 44% et mâles : 55%) est différente de celles observées pour les CS, J5 et J5+cVA (respectivement 74, 90 et 89%,  $G^2_{(3ddl)} = 36,2$  ;  $p < 0,001$  chez les femelles et 86, 89 et 93%,  $G^2_{(3ddl)} = 26,5$  ;  $p < 0,001$  chez les mâles).



De même, le choix *Fem CS/Fem CS + cVA*, déclenche une variation comparable et significative de la fréquence d'atterrissage en fonction de l'expérience dans les 2 sexes. Mais, face à ce choix, ce sont les sujets CS qui atterrissent le plus souvent (80% chez les femelles et 95% chez les mâles), alors que les autres types de sujets atterrissent beaucoup moins souvent (de 41 à 46%,  $G^2_{(3ddl)} = 14,7$  ;  $p = 0,002$  pour les femelles et de 51 à 53%,  $G^2_{(3ddl)} = 12,9$  ;  $p = 0,005$  pour les mâles).

Alors que les fréquences d'atterrissage face au choix *Mâle sim/Fem sim* ne varient pas significativement en fonction de l'expérience chez les femelles, la différence est significative pour les mâles ( $G^2_{(3ddl)} = 12,7$  ;  $p = 0,005$ ), les mâles J1 (61%) atterrissant moins fréquemment que les mâles J5 et J5+cVA (90 et 93%), la fréquence d'atterrissage des mâles CS étant intermédiaire (79%).

Il est à noter que les variations de fréquences de décollage et d'atterrissage sont parallèles pour le choix *Mâle CS/PF* chez les sujets des 2 sexes et pour le choix *Mâle sim/Fem sim* pour les sujets mâles, ce qui amplifierait l'effet si on envisageait l'atterrissage en fonction du nombre de sujets testés et non pas en fonction du nombre de sujets ayant décollés.

### **Choix de nourriture**

Pour les choix d'atterrissage, les résultats varient de nouveau suivant le sexe, l'expérience des mouches et le choix de nourriture proposé (**Figure 14 – c et f**).

L'analyse des choix a été effectuée à 2 niveaux apportant des informations complémentaires : d'une part, j'ai testé la significativité de chaque choix présenté pour chaque traitement (test z), et d'autre part j'ai vérifié si les résultats obtenus pour chacun des choix de nourriture varient en fonction du traitement (test  $G^2$  de Wilks).

Chez les deux sexes, le témoin composé de deux sources « *nourritures vierges* » n'induit aucun choix significatif, et aucune variation en fonction de l'expérience préalable (le choix pour la plateforme de gauche varie de 50,0 à 62,5 % chez les femelles :  $G^2_{(3ddl)} = 1,1$  ;  $p = 0,788$ , et de 41 à 61%, chez les mâles :  $G^2_{(3ddl)} = 2,5$  ;  $p = 0,479$ ). Il n'existe donc pas de biais d'asymétrie dans notre dispositif.

Chez les femelles, le choix est significatif pour des sujets J1 face au choix *Mâle CS /PF* et *Fem CS/PF* et pour des femelles J1 et J5+cVA auxquelles est présenté le choix

*Fem CS/Fem CS +cVA* (**Figure 14 – c**). Dans le premier cas, les sujets femelles J1 préfèrent le milieu *Mâle CS* au milieu *PF* (80% vs. 21%),  $z = 3,5$  ;  $p < 0,001$ ), alors qu'elles préfèrent ce milieu *PF* face au milieu *Fem CS* (73% vs. 27%,  $z = -2,4$  ;  $p = 0,018$ ). Ce même milieu *Fem CS* est aussi délaissé par les femelles J1 et J5+cVA lorsqu'elles sont mises face au choix *Fem CS/Fem CS + cVA* (respectivement 75 vs. 25%,  $z = -2,7$  ;  $p = 0,008$  et 72 vs. 28%,  $z = -2,3$  ;  $p = 0,022$ ).

Chez les femelles, des variations de choix en fonction de l'expérience n'ont été mises en évidence que pour les choix *Mâle CS/PF* et *Fem CS/Fem CS +cVA*. Dans le premier cas, le choix effectué par les femelles J1 est significativement différent de celui fait par les femelles J5+cVA ( $G^2_{(3ddl)} = 7,5$  ;  $p = 0,05$  ; nourriture *Mâle CS* choisie respectivement à 80% et à 48%), les 2 choix observés pour les 2 autres traitements étant intermédiaires (61 et 64%). A l'opposé, face au choix *Fem CS/Fem CS +cVA*, les femelles J1 et J5+cVA préfèrent significativement plus ( $G^2_{(3ddl)} = 9,2$  ;  $p = 0,027$ ) le milieu supplémenté en *cVA* (75 et 72%) que les sujets CS et J5 (46 et 47%).

Chez les mâles (**Figure 14 – f**), les CS, J1 et J5 choisissent préférentiellement le milieu *Mâle CS* face au milieu *PF* (respectivement à 77%,  $z = -2,9$  ;  $p = 0,004$  ; 76%,  $z = -3,2$  ;  $p = 0,001$  & 79%,  $z = -2,7$  ;  $p = 0,008$ ) alors que ce choix n'est pas significatif pour les sujets J5+cVA (46%). Ces mêmes sujets mâles J5+cVA préfèrent le milieu *Mâle CS* face au milieu *Fem CS* (75%) ( $z = -2,5$  ;  $p = 0,014$ ).

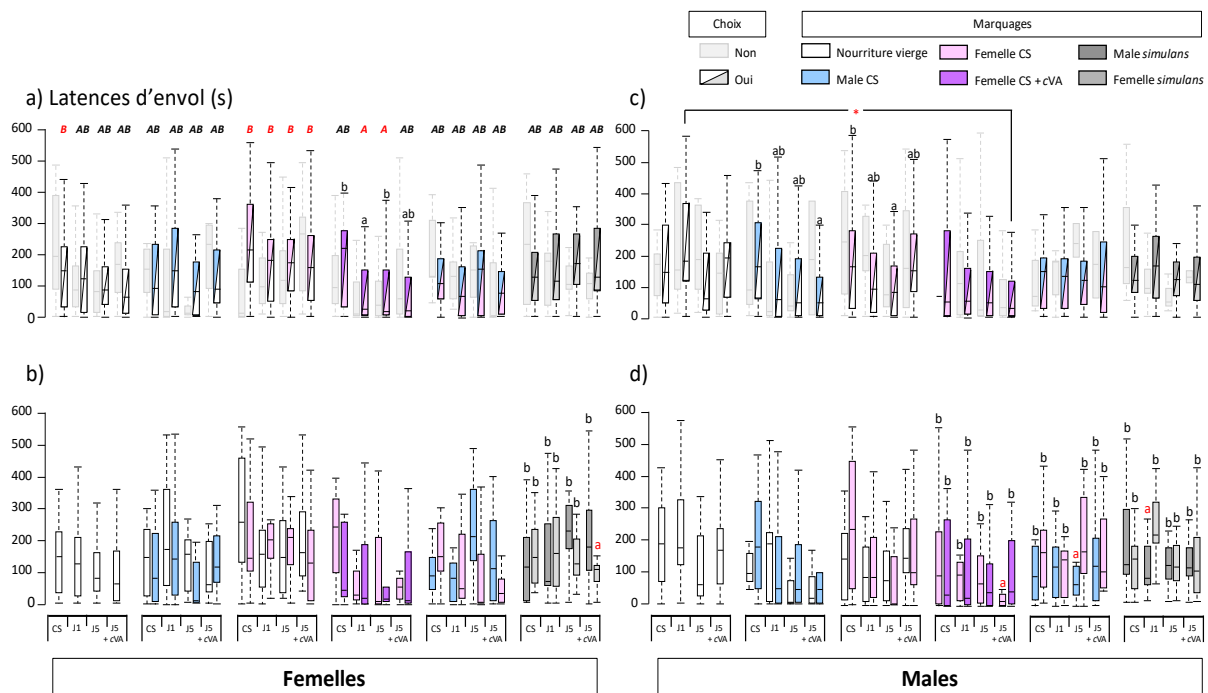
Chez le mâle, le choix entre *Mâle CS/PF* varie en fonction de la nature d'imprégnation similairement à ce qui est observé chez la femelle : le choix du mâle est plus faible lorsque le sujet est un sujet J5+cVA.

Le choix *Mâle sim/Fem sim* n'est significatif que pour les sujets mâles J5 (*Mâle sim* : 78%,  $z = -2,6$  ;  $p = 0,011$ ) et ne montre aucune variation en fonction de l'expérience du sujet.

### Latences d'envol

Il m'a paru intéressant d'envisager dans un premier temps les latences d'envol selon que les sujets ont ou non effectué un choix final. Aucune différence significative n'a été mise en évidence en absence de choix que ce soit sur l'ensemble des sujets (femelles ou mâles) ou séparément en fonction de la paire de nourritures proposées (**Figure 15 – a et c**).

En revanche, si on considère les latences de vol des seuls sujets ayant effectué un choix, les latences d'envol des mouches testées sont variables et comparables entre sexes (entre  $94 \pm 17$  et  $212 \pm 28$  sec pour les femelles, et entre  $87 \pm 15$  et  $225 \pm 31$  sec pour les mâles). La comparaison de l'ensemble des latences d'envol (tous choix proposés et tous traitements confondus) montre ainsi des différences chez les sujets femelles et mâles ( $KW_{23ddl} = 76,1$  et  $64,2$  respectivement ;  $p < 10^{-4}$ ).



**Figure 15** – Latences d'envol des femelles et mâles *D. melanogaster* testées en tunnel de vol, ayant effectué ou non un choix (**a et c**), et le cas échéant, séparées en fonction de la nourriture choisie (**b et d**). Le traitement pré-imaginal des mouches sujets est indiqué à la base des graphiques **b et d**. Les barres grisées (**a et c**) représentent les latences des mouches n'ayant pas fait de choix et le code couleur indique la nature du marquage de la nourriture choisie. Lorsque deux nourritures vierges ont été proposées, les données ont été regroupées.

Chez les femelles (**Figure 15 - a**), les latences d'envol des CS face au choix entre *PF* ( $185 \pm 23$  sec), ainsi que de toutes les femelles (quelle que soit leur expérience préalable, entre  $162 \pm 18$  et  $212 \pm 28$  sec) face au choix *Fem CS/PF* sont significativement supérieures à celles des femelles J1 et J5 face au choix *Fem CS/Fem CS + cVA* ( $94 \pm 17$  et  $99 \pm 17$  sec), les autres valeurs formant un groupe intermédiaire.

Les analyses détaillées en fonction du choix proposé mettent en évidence une différence significative ( $KW_{3ddl} = 10,6$  ;  $p = 0,014$ ) entre les sujets CS ( $171 \pm 25$  sec) et J1 et les sujets J1 et J5 ( $94 \pm 17$  sec et  $99 \pm 17$  sec) pour le choix *Fem CS/Fem CS + cVA*.

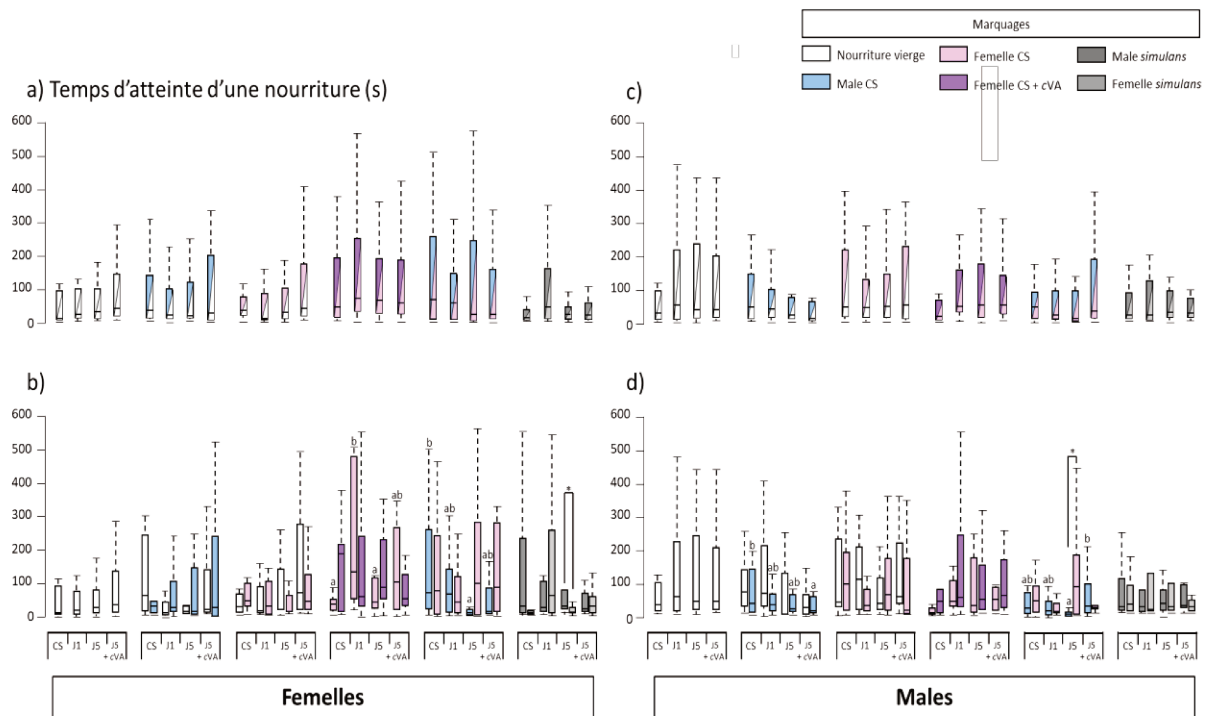
Dans le cas des mâles (**Figure 15 - c**), seules les latences d'envol des mâles J1 face au choix entre *PF* ( $225 \pm 31$  sec) est significativement supérieur au choix des J5+cVA face au choix *Fem CS/Fem CS + cVA* ( $87 \pm 15$  sec), toutes les autres valeurs formant un groupe intermédiaire.

Les analyses en fonction du choix proposé montrent une différence significative des temps d'envol pour les mâles mis en présence des choix *Mâle CS/PF* ( $KW_{3ddl} = 10,5$  ;  $p = 0,015$ ) et *Fem CS/PF* ( $KW_{3ddl} = 8,1$  ;  $p = 0,044$ ). Dans les 2 cas, ce sont les mâles CS qui décollent plus tardivement ( $193 \pm 26$  et  $211 \pm 29$  sec) que les sujets J5+cVA pour le premier choix ( $99 \pm 21$  sec) et J5 ( $107 \pm 17$  sec) pour le second.

Lorsque les latences de décollage des sujets sont analysées en fonction du choix effectué (**Figure 15 - b et d**), quatre différences sont mises en évidence : 1°) Chez les femelles, les J5 + cVA décollent plus vite lorsqu'elles choisissent le milieu *Fem sim* de la paire *Mâle sim/Fem sim* ( $U_{7ddl} = 27,5$  ;  $p = 0,027$ ), 2°) Chez les mâles, les J5+cVA s'envolent plus rapidement lorsqu'ils choisissent le milieu *Fem CS* dans la paire *Fem CS/Fem CS + cVA* ( $U_{7ddl} = 43$  ;  $p = 0,013$ ), 3°) les mâles J5 le milieu *Mâle CS* dans la paire *Mâle CS/Fem CS* ( $U_{7ddl} = 126$  ;  $p = 0,007$ ) et 4°) les mâles J1 le milieu *Mâle sim* de la paire *Mâle sim/Fem sim* ( $U_{7ddl} = 946$  ;  $p = 0,019$ ).

### Temps mis pour atteindre une nourriture

Les temps mis pour atteindre une des nourritures sont variables et comparables entre sexes (entre  $48 \pm 13$  et  $149 \pm 38$  sec pour les mâles, et  $58 \pm 19$  et  $166 \pm 33$  sec pour les femelles) (**Figure 16 – a et c**). Une analyse globale préliminaire (tout choix proposé et tout traitement confondus) n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative que ce soit chez les sujets mâles ou chez les sujets femelles ( $KW_{23ddl} = 32,4$  ;  $p = 0,078$  et  $28,9$  ;  $p = 0,185$ , respectivement). De même, une analyse pour chaque choix proposé ne montre aucune différence significative en fonction de l'expérience préalable, quel que soit le choix ou le sexe du sujet ( $p$  variant de 0,150 à 0,765 pour les femelles et de 0,069 à 0,985 pour les mâles).



**Figure 16** – Temps mis par les femelles et mâles *D. melanogaster* testés en tunnel de vol pour atterrir sur une nourriture après leur envol. Les résultats ont été regroupés par choix proposé (**a** et **c**), puis séparés par nourriture choisie (**b** et **d**). Le traitement pré-imaginal des mouches sujets est indiqué à la base des graphiques **b** et **d**. Le code couleur indique la nature du marquage de la nourriture choisie. Lorsque deux nourritures vierges ont été proposées, les données ont été regroupées.

Dès lors, pour chaque sexe, j'ai analysé ces résultats pour chaque paire de nourritures proposées, en fonction du traitement et du choix effectué (**Figure 16 - b** et **d**). Dans les deux cas les réponses aux témoins composés des *PF/PF* ne sont pas différentes entre traitements (femelles :  $KW_{3ddl} = 2,7$  ;  $p = 0,439$  ; mâles :  $KW_{3ddl} = 5,1$  ;  $p = 0,163$ ).

Les femelles CS ( $57 \pm 64$  sec) et J5 ( $101 \pm 128$  sec) qui choisissent la nourriture *Fem CS* du choix *Fem CS/Fem CS + cVA* atterrissent significativement plus rapidement que leurs homologues J1 ( $239 \pm 221$  sec) et J5+cVA ( $145 \pm 140$  sec) ( $KW_{3ddl} = 10,8$  ;  $p = 0,013$ ), (**Figure 16 - b**).

De la même manière, les mâles J5 + cVA ( $68 \pm 112$  sec) présentent des vols significativement plus courts que les CS ( $122 \pm 174$  sec) lorsqu'ils choisissent la nourriture *Mâle CS* du choix *Mâle CS/PF* ( $KW_{3ddl} = 8,5$  ;  $p = 0,037$ ) (**Figure 16 - d**).

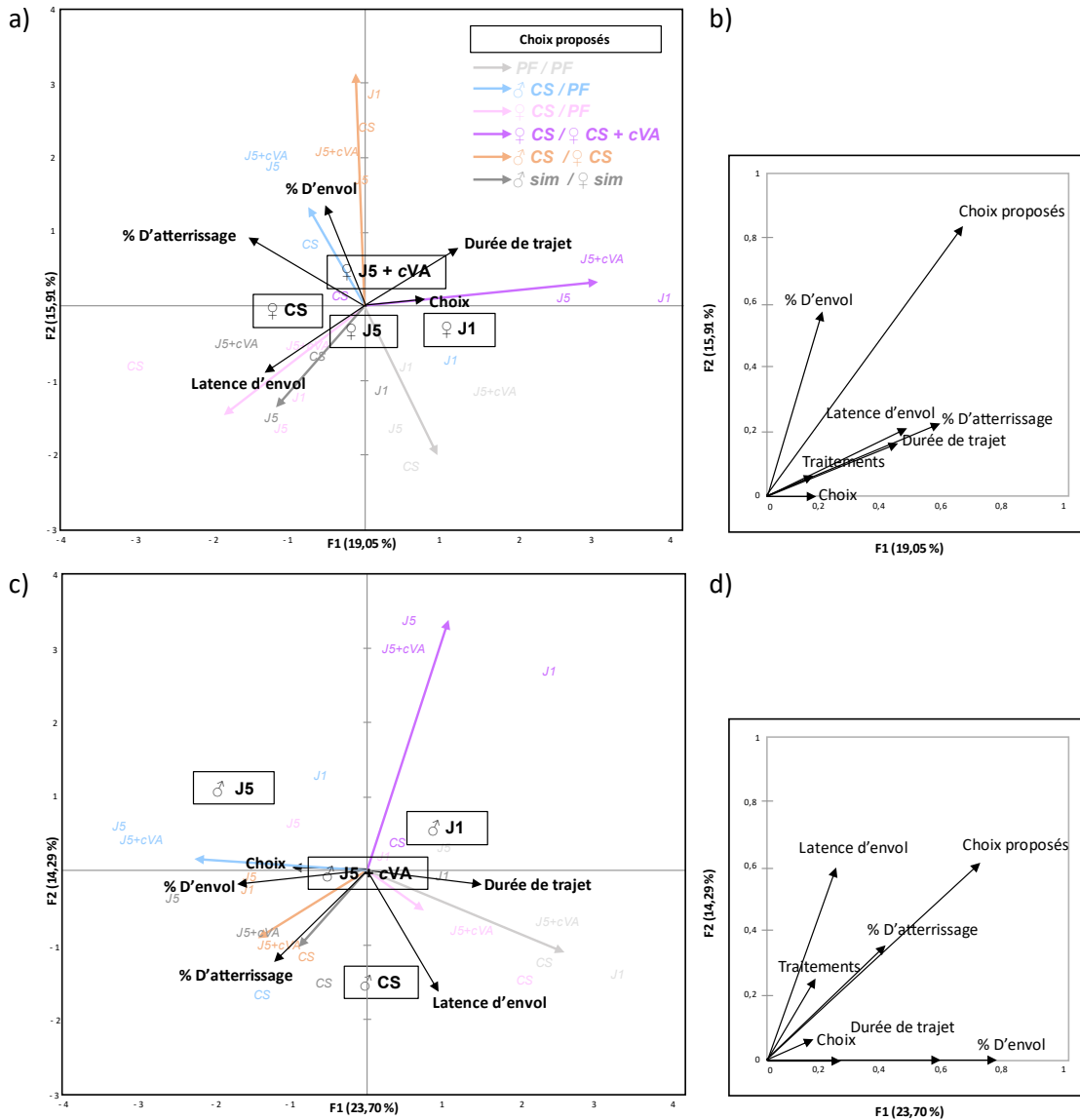
Le choix de nourritures *Fem CS/PF* n'entraîne aucune différence entre et au sein des traitements d'exposition, que ce soit pour les mâles ou les femelles.

Pour les deux sexes, les individus J5 sont les plus rapides à atteindre la nourriture *Mâle CS* dans le choix de nourritures *Mâle CS/Fem CS* (femelles J5 :  $94 \pm 147$  sec vs. CS :  $135 \pm 146$  sec, J1 :  $155 \pm 192$  sec, et J5+cVA :  $68 \pm 91$  sec ; mâles J5 :  $28 \pm 37$  sec vs. CS :  $65 \pm 87$  sec, J1 :  $76 \pm 118$  sec, et J5+cVA :  $115 \pm 145$  sec).

Enfin, concernant le choix de nourriture *Mâle sim/Fem sim*, les femelles J5 atteignent plus rapidement la nourriture *Fem sim* ( $25 \pm 25$  sec) que la nourriture *Mâle sim* ( $114 \pm 170$  sec) après leur envol ( $U = 22,5$  ;  $p = 0,021$ ).

Pour mieux appréhender les possibles interactions entre les traitements, les choix proposés (variables quantitatives) et les différentes variables mesurées (latence d'envol, durée de trajet, fréquence de vol, et d'atterrissage, indice de choix, j'ai effectué deux Analyses de données mixtes selon le sexe des sujets (**Figure 17**).

Le premier plan de chacune de ces analyses explique respectivement 35% pour les femelles et 38 % pour les mâles de la variabilité totale des données considérées



**Figure 17** – Analyses en Composantes Principales sur données mixtes et corrélations des variables de tunnel de vol. Les interactions entre traitements, choix proposés (variables quantitatives) et les différentes variables mesurées (latence d'envol, durée de trajet, fréquence de vol, et d'atterrissage, choix) sont représentées pour les femelles (**a**) et les mâles (**c**) testés. Le code couleur indique les choix de nourritures proposés. Les interactions entre variables qualitatives et quantitatives sont résumées dans les encarts **b** et **d**.

L'étude des corrélations entre variables qualitatives et quantitatives (**Figure 17 – b et d**) montre que chez les sujets des deux sexes, l'indice de choix est une variable peu importante qui n'influence faiblement que le facteur 1 (qui explique respectivement 19 et 24% de la variabilité totale des échantillons pour les femelles et les mâles).

Chez les sujets femelles (**Figure 17 – b**), les latences d'envol, durée pour atteindre la nourriture et fréquence d'atterrissage sont corrélées au traitement pré-imaginal du sujet et influencent principalement le premier facteur. Le choix proposé aux sujets femelles et la fréquence de vol sont corrélés et influencent principalement le second facteur (16% de la variabilité totale).

Chez les mâles (**Figure 17 – d**), l'indice de choix est corrélé aux fréquences de vol et temps mis pour atteindre la nourriture, et influencent principalement le premier facteur. Le traitement pré-imaginal des sujets et le choix proposé sont corrélés à la fréquence d'atterrissage. L'ensemble de ces variables influençant les 2 premiers facteurs de l'analyse.

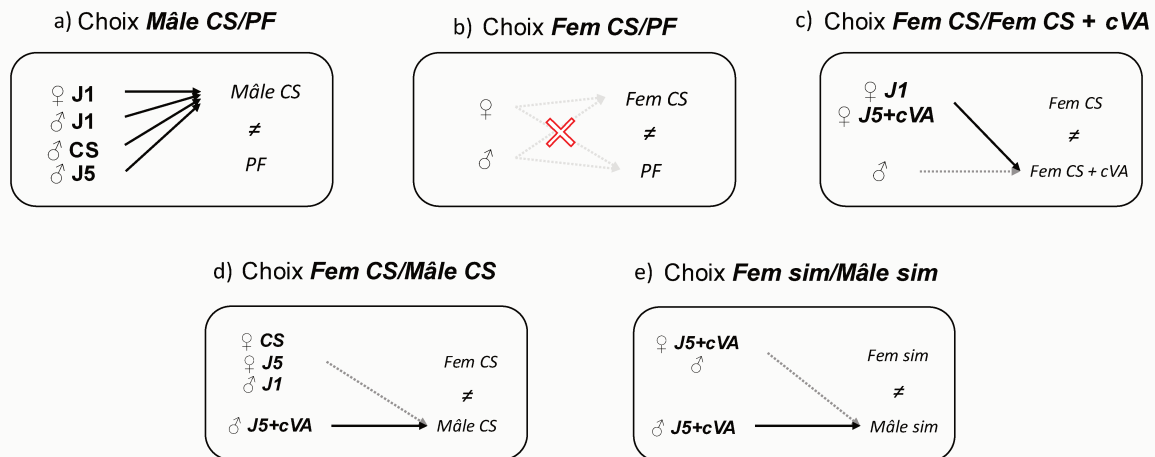
Concernant les ACP (**Figure 17 – a et c**), si on envisage la distribution des différentes modalités des variables qualitatives (choix et traitement), on constate que l'effet des traitements (en termes de dispersion) est beaucoup plus important chez les mâles que chez les femelles.

Pour les sujets femelles (**Figure 17 – a**), les choix *Fem CS/PF* et *Mâle sim/Fem sim* sont comparables et proches du choix entre *PF/PF* sur la moitié inférieure du plan et fortement corrélés aux latences d'envol des mouches. Les choix *Mâle CS/PF*, *Mâle CS/Fem CS* et *Fem CS/Fem CS + cVA* se répartissent sur l'autre moitié de ce même plan, les deux premiers choix étant plus proches entre eux que du troisième. Il est à noter que pour ces trois choix, les femelles J5 sont toujours les plus proches des femelles J5+cVA, ce qui n'est pas le cas pour les 3 autres choix (*Fem CS/PF*, *Mâle sim/Fem sim*, *PF/PF*).

Dans le cas des sujets mâles (**Figure 17 – c**), on constate que le traitement J5+cVA est intermédiaire entre les mâles J1 et J5 (sur le facteur 1) et entre les mâles CS et J5 sur le facteur 2. De manière générale, le choix *Fem CS /Fem CS + cVA* se distingue des autres selon le facteur 2. Les choix de nourritures opposants les marquages des deux sexes (*Mâle CS/Fem CS* et *Mâle sim/Fem sim*) sont quasiment confondus et fortement corrélés aux fréquences d'envol et d'atterrissage des mouches.



Résumé des résultats principaux de Tunnel de vol



**a) Choix Mâle CS/PF**

Les individus J1 atterrissent moins fréquemment que les autres traitements.  
 Les individus J1 et les mâles CS et J5+cVA préfèrent la nourriture *Mâle CS*.  
 Les mâles CS montrent un retard d'envol par rapport aux autres mâles.

**b) Choix Fem CS/PF**

Les mâles et femelles testés ne montrent aucune différence de fréquences d'envol, d'atterrissage ni de choix.  
 Les femelles montrent les temps d'envol les plus long pour ce choix de nourriture.  
 Les mâles CS montrent un retard d'envol par rapport aux mâles J5+cVA.

**c) Choix Fem CS/Fem CS+cVA**

Les individus CS atterrissent plus fréquemment que les autres traitements.  
 Les femelles J1 et J5+cVA préfèrent la nourriture *Fem CS+cVA*.  
 Les mâles montrent une préférence non significative pour la nourriture *Fem CS+cVA*.

**d) Choix Fem CS/Mâle CS**

Les mâles J5+cVA préfèrent la nourriture *Mâle CS*.  
 Les femelles CS et J5 et les mâles J1 montrent une préférence non significative pour la nourriture *Mâle CS*.  
 Les mâles atteignent plus rapidement la nourriture que les femelles.

**e) Choix Fem sim/Mâle sim**

Les mâles J1 atterrissent moins que les mâles J5 et J5+cVA  
 Les mâles J5+cVA préfèrent la nourriture *Mâle sim*.  
 Les femelles J5+cVA et les mâles CS, J1 et J5 montrent une préférence non significative pour la nourriture *Mâle sim*.  
 Les femelles J1 atteignent moins rapidement la nourriture que les autres femelles.

### **Analyses chimiques des odeurs de Drosophiles et des milieux marqués**

J'ai caractérisé les composés volatiles émis par les différents stimuli utilisés en tunnel de vol, en effectuant l'échantillonnage d'espace de tête de ces différents milieux suivi d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse (en collaboration avec Jean-Marie Heydel et Remy Reynaud).

L'échantillonnage d'espace de tête a été effectué sur :

- Un témoin vide ;
- Des mouches de chaque sexe de *D. melanogaster* et *D. simulans*, en absence de nourriture ;
- Des mouches de chaque sexe de *D. melanogaster* et *D. simulans*, en présence de nourriture ;
- De la nourriture standard.

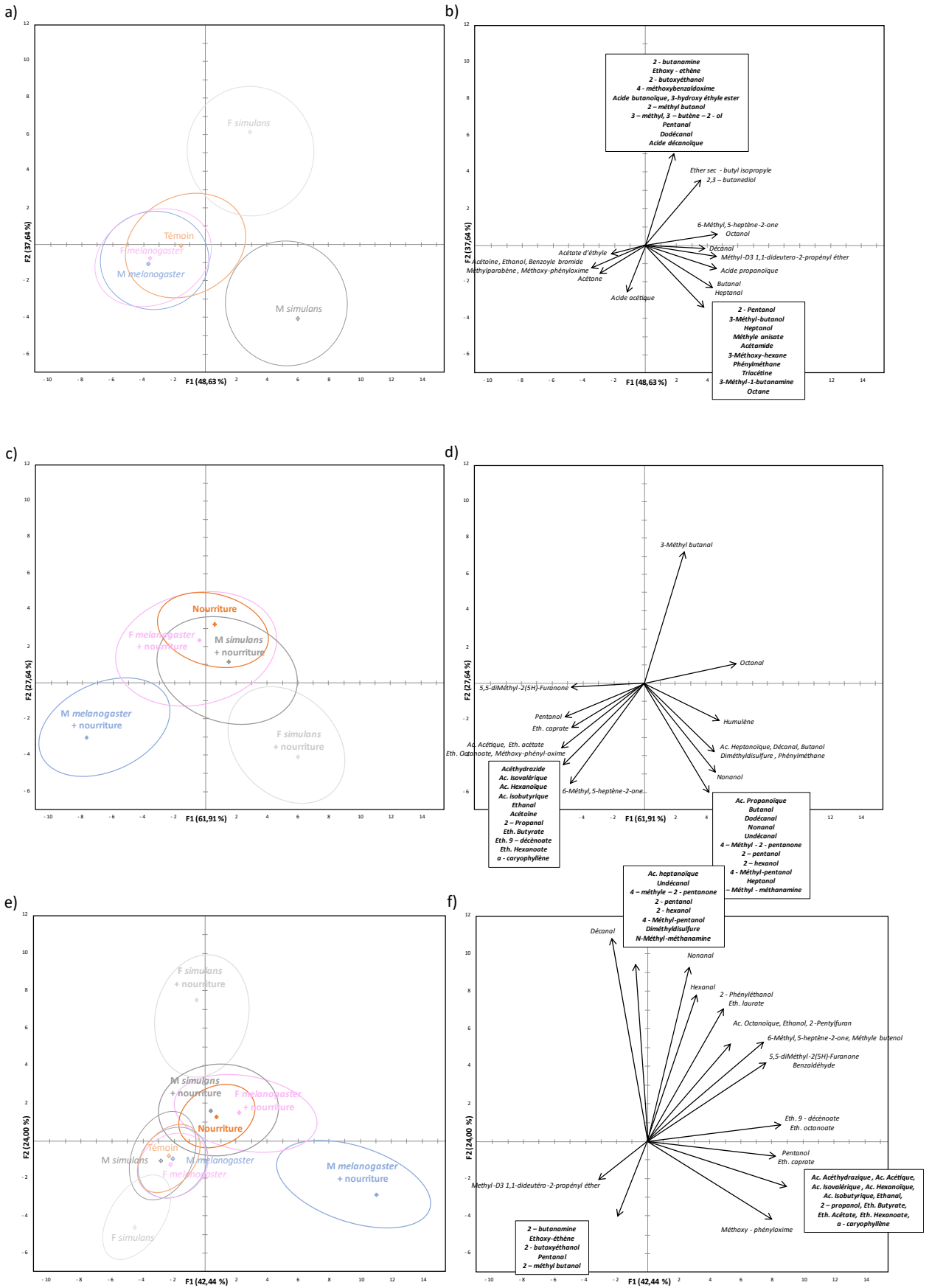
Ces analyses ont été complétées par le même échantillonnage sur un flacon contenant 100 ng de cVA synthétique en absence ou en présence de nourriture afin de rechercher spécifiquement ce composé.

Au total, toutes conditions confondues, 99 composés ont été identifiés, comprenant 10 acides, 15 aldéhydes, 8 cétones, 19 alcools, 19 esters, 3 amines, 1 alcanes et 24 composés classés comme « divers » (**Tableau 4 [Annexe]**).

Le cVA n'a été détecté dans aucune des conditions.

Les procédures de Kaiser-Meyer-Olkin ont permis de sélectionner 37 des 47 composés détectés dans les extraits en absence de nourriture, 37 des 72 détectés en présence de nourriture, et 45 des 99 détectés en combinant ces données.

L'ensemble des données a été représenté par des Analyses en Composantes Principales (**Figure 18**). Le premier plan de chacune de ces analyses explique respectivement 86,3, 89,6 et 66,4 % de la variabilité totale des données considérées.



**Figure 18** - Analyses en composantes principales par Bootstrap des principaux odorants issus de la présence des *Drosophiles* et des nourritures marquées utilisées en tunnel de vol. Les différentes analyses discriminent les odeurs émanant de la présence des *D. melanogaster* et *D. simulans* sans (**a** et **b**) ou avec (**c** et **d**) de la nourriture. L'ensemble des groupes est finalement représenté (**e** et **f**). Les marquages ont été utilisés comme individus et les odorants comme variables actives. Les odorants les plus pertinents (KMO > 0,5) sont représentés dans les cercles de corrélation respectifs (**b**, **d** et **f**). Les odorants encadrés sont corrélés, les odorants alignés ne sont pas corrélés mais ont été regroupés par soucis de clarté.

Pour l'ensemble des conditions « sans nourriture », le premier axe (qui explique 49% de la variabilité totale des échantillons) sépare les 2 espèces (**Figure 18 - a**), alors que le deuxième axe sépare les mâles et femelles uniquement pour les *D. simulans*. La séparation entre les 2 espèces sur l'axe 2 (38% de la variation totale) est liée à l'opposition entre 2 ensembles de composés : les *D. melanogaster* sont caractérisés par l'acétoïne, l'éthanol, le benzoyle bromide, le méthylparaben, le méthoxy-phenyloxime, l'acétate d'éthyle, l'acide acétique et l'acétone, et les *simulans* par l'éther sec - butyle isopropyle, le 2,3 - butanediol, le 6-méthyl, 5-heptène-2-one, l'octanol, le décanal, le méthyl-D3 1,1-didéutéro-2-propényl éther, l'acide propanoïque, le butanal et l'heptanal.

La séparation des deux sexes de *D. simulans* se fait à son tour par deux ensembles de produits très corrélés entre eux : les mâles *simulans* se caractérisent par le 2 - pentanol, le 3-méthyl-butanol, l'heptanol, le méthyle anisate, l'acétamide, le 3-méthoxy-hexane, le phénylméthane, le triacétine, le 3-méthyl-1-butanamine et l'octane ; les femelles *simulans* se séparent des mâles principalement par l'éther sec - butyle isopropyle, le 2,3 - butanediol, ainsi que par l'ensemble 2 - butanamine, l'éthoxy - éthène, le 2 - butoxyéthanol, le 4 - méthoxybenzaldoxime, l'acide butanoïque, le 3-hydroxy éthyle ester, le 2 - méthyl butanol, le 3 - méthyl, 3 - butène - 2 - ol, le pentanal, le dodécanal et l'acide décanoïque.

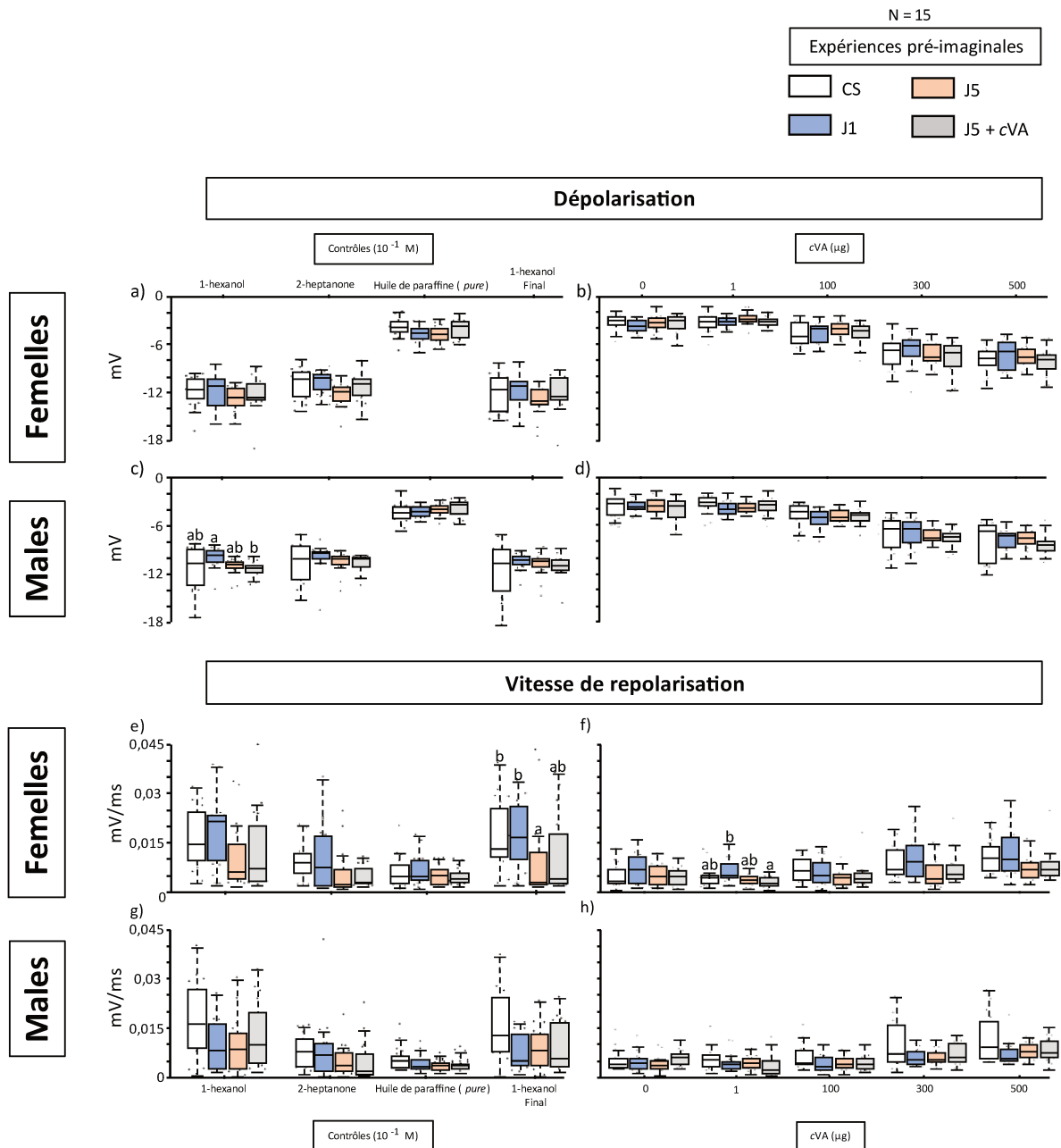
En ce qui concerne les extraits « avec nourriture » (**Figure 18 - c**), on constate que les mâles *simulans* et les femelles *melanogaster* ne se séparent pas de l'odeur de la seule nourriture, alors que les mâles *melanogaster* et les femelles *simulans* se séparent de cet ensemble suivant l'axe 2 (28% de la variation totale) tout en s'éloignant les uns des autres suivant l'axe 1 (62% de la variation totale).

Les composés caractérisant les mâles sont le *6-méthyl,5-heptène-2-one*, le *5,5-diméthyl-2(5H)-furanone*, le *pentanol*, l'*éthyle caprate*, l'*acide acétique*, l'*éthyle acétate*, l'*éthyle octanoate* et le *méthoxy-phenyloxime* ainsi que le groupe de composés corrélés formé de l'*acide acétyldrazique*, l'*acide isovalérique*, l'*acide hexanoïque*, l'*acide isobutyrique*, l'*éthanal*, l'*acétoïne*, le *2 – propanal*, l'*éthyle butyrate*, l'*éthyle 9 – décénoate*, l'*éthyle hexanoate* et l'*α - caryophyllène*. Ceux correspondant aux femelles simulans sont l'*octanal*, l'*humulène*, l'*acide heptanoïque*, le *décanal*, le *butanol*, le *diméthylsulfure*, le *phénylméthane*, le *nonanol* et le groupe corrélé formé de l'*acide propanoïque*, du *butanal*, *dodécanal*, *nonanal*, *undécanal*, du *4 – méthyl - 2 – pentanone*, *2 – pentanol*, *2 – hexanol*, *4 - méthyl pentanol*, de l'*heptanol* et du *N – méthyl methanamine*.

L'analyse globale (**Figure 18 – e**), dont le premier plan explique 66% de la variance totale, confirme les 2 précédentes et illustre bien que la présence de la nourriture entraîne une variation sexuellement dimorphique différente selon l'espèce.

## Electroantennographie

Afin de déterminer si les différences comportementales observées en tunnel de vol pouvaient être mise en rapport avec une altération de la détection périphérique du cVA, j'ai réalisé des enregistrements électroantennographiques sur les femelles et mâles issus des 4 traitements pré-imaginaux (CS, J1, J5 et J5 + cVA) en réponse à 5 doses de cVA.



**Figure 19** – Amplitudes de dépolarisation et vitesses de repolarisation des antennes de femelles (a, b et e, f) et mâles (c, d et g, h) *D. melanogaster* obtenues par enregistrements électrophysiologiques. Les antennes ont été soumises à 4 odorants contrôles et 5 doses de cVA. Le code couleur correspond aux différents traitements pré-imaginaux.

### Dépolarisations

Les amplitudes de dépolarisation sont superposables entre les deux sexes (**Figure 19 – a à d**).

Aucune différence n'est observable entre les réponses initiales et finales à l'hexanol quel que soit le sexe et l'imprégnation considérée (tests de Wilcoxon pour échantillons appariés - **Tableau 3 [Annexe]**), ce qui confirme que la réponse électrophysiologique des mouches ne varie pas sur la durée totale des tests.

D'autre part, le contrôle négatif (huile de paraffine,  $3 \pm 1$  mV et  $3 \pm 1$  mV pour les femelles et les mâles) déclenche des réponses beaucoup plus faibles que les 2 contrôles positifs (1-hexanol :  $10,9 \pm 2$  mV et  $9,6 \pm 1,56$  mV pour les femelles et les mâles, respectivement ; 2-heptanone :  $10 \pm 1,6$  mV et  $9,2 \pm 1,7$  mV). En ce qui concerne les contrôles, aucune différence significative de dépolarisation en fonction du traitement n'a pu être mise en évidence, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles.

Le cVA induit des réponses dose-dépendantes similaires entre sexes. Les dépolarisations les plus fortes sont obtenues pour 500 µg de cVA ( $7,9 \pm 1,7$  mV pour les femelles et  $7,7 \pm 1,6$  mV pour les mâles). Pour chaque dose, aucune différence significative n'est observée entre traitements.

Il est à noter que, sauf pour les réponses les plus faibles (paraffine, hexane et cVA à 1 et 100 µg), la variabilité de la dépolarisation est toujours plus importante chez les individus CS que chez les autres traitements.

### Repolarisations

Là encore, aucune différence n'est observable entre les réponses initiales et finales à l'hexanol quel que soit le sexe et l'imprégnation considérée (**Tableau 3 [Annexe]**) (**Figure 19 – e à h**).

L'analyse des repolarisations ne révèle que deux différences significatives en fonction du traitement, et ce uniquement chez les femelles.

En ce qui concerne les contrôles (**Figure 19 – e**), l'hexanol final déclenche des repolarisations significativement inférieures chez les femelles J5 par rapport aux femelles CS et J1 ( $0,005 \pm 0,005$  mV/ms vs.  $0,016 \pm 0,01$  mV/ms -  $KW_{3ddl} = 8,434$  ;  $p = 0,038$ ), les réponses des femelles J5+cVA étant intermédiaires.

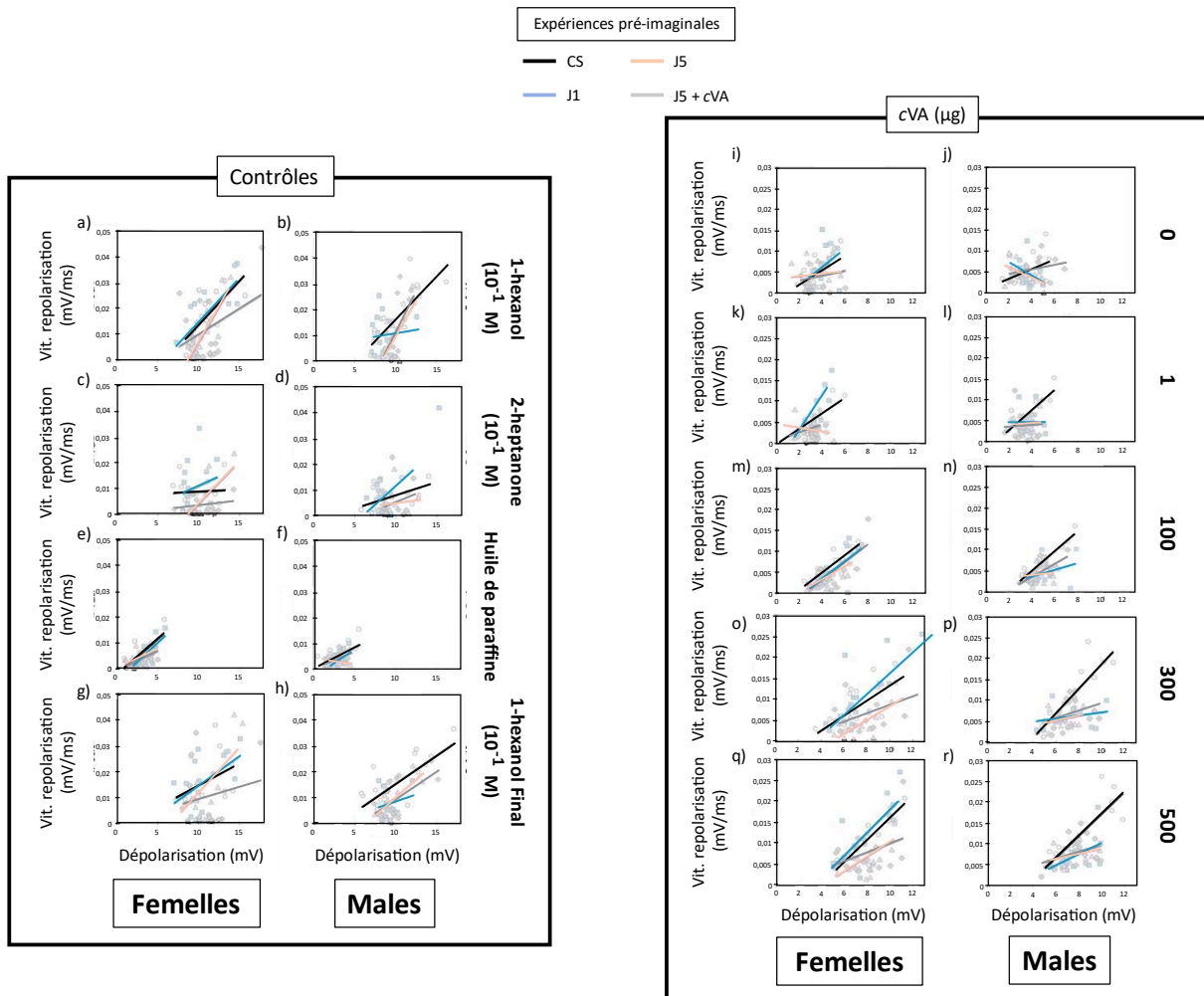
En ce qui concerne le cVA (**Figure 19 – f**), la dose de 1 µg déclenche une repolarisation significativement plus rapide chez les femelles J1 que chez les femelles J5+cVA ( $0,006 \pm 0,005$  mV/ms vs.  $0,003 \pm 0,002$  mV/ms -  $KW_{3ddl} = 8,253$  ;  $p = 0,041$ ), la repolarisation des femelles CS et J5 étant entre ces 2 extrêmes.

Chez les mâles, aucune différence significative entre traitements d'expositions n'est à relever, quel que soit le composé contrôle ou la dose de cVA présentée (**Figure 19 – g et h**). En revanche, si chez les femelles ceci a disparu, on constate que la variabilité de la repolarisation des mâles CS soumis à l'hexanol (initial et final) et aux deux doses les plus grandes de cVA est plus importante que pour les mâles issus des 3 autres traitements pré-imaginaux.



### Corrélations dépolarisations et repolarisations

A part un effet "dose", cette première analyse des résultats d'électrophysiologie ne met pas en évidence de différences flagrantes entre traitements et/ou dose. Aussi, j'ai envisagé la possibilité d'un effet sur la corrélation entre dépolarisation et repolarisation (**Figure 20**).



**Figure 20** – Corrélations des vitesses de repolarisations et des amplitudes de dépolarisations des antennes de femelles et mâles *D. melanogaster* obtenues par enregistrements électrophysiologiques en réponse à 4 odorants contrôles et 5 doses de cVA. Le code couleur correspond aux différents traitements pré-imaginale.

De manière générale, il y a une bonne corrélation entre amplitude de dépolarisation et vitesse de repolarisation, avec une régression positive entre ces deux paramètres, ce qui revient à dire que la vitesse de repolarisation croît avec l'amplitude de la dépolarisation.

En ce qui concerne les 4 contrôles, les corrélations sont très semblables entre mâles et femelles CS et présentent quelques faibles variations pour les autres traitements (J1, J5 et J5+cVA) (**Figure 20 - a, c, e et g** pour les femelles ; **b, d, f et h** pour les mâles).

Les résultats obtenus avec le cVA (**Figure 20 - i à r**) montre à nouveau un effet dose réponse différent en fonction du sexe et/ou de l'expérience des sujets.

Chez les mouches CS des deux sexes, on observe une accentuation de la pente de la corrélation, avec un déplacement de celle-ci vers la droite du graphique : plus la dose de cVA présentée est forte, plus la dépolarisation est grande et la repolarisation rapide.

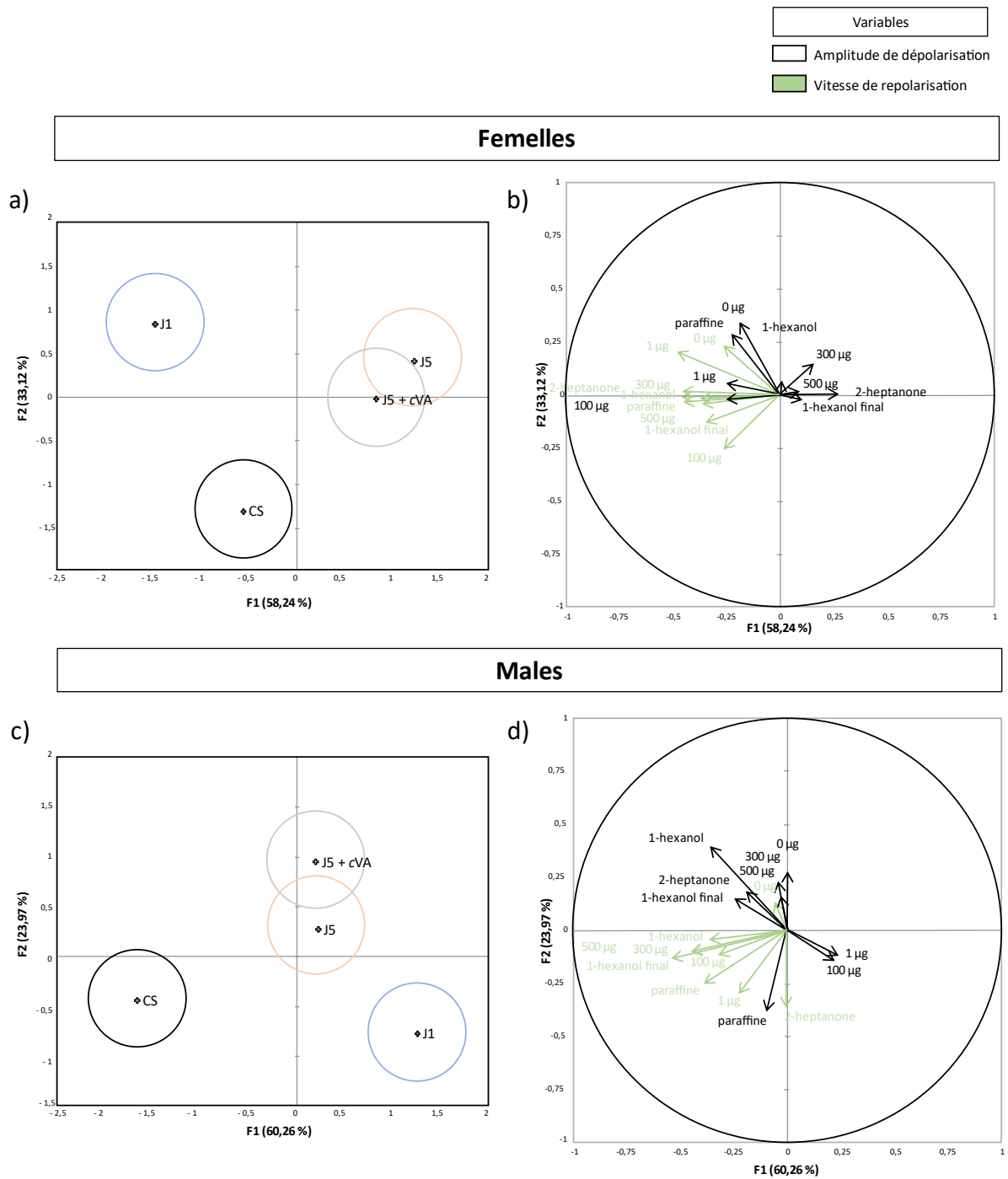
Chez les femelles, les J1 ont une évolution similaire à celle observée pour les CS, hormis avec la dose de 1  $\mu\text{g}$  (**Figure 20 - k**). La distribution est différente pour les femelles J5 et J5+cVA, ces dernières étant presque intermédiaires entre les CS et les J5.

Pour les mâles, les J1 sont plus proches des J5 et J5+cVA que des CS sauf face à l'hexane pur (**Figure 20 - j**).

J'ai finalement effectué une Analyse Factorielle Discriminante en utilisant les amplitudes de dépolarisation et les vitesses de repolarisation pour chaque dose comme variables quantitatives et les traitements pré imaginaires comme groupes. Les deux représentations expliquent respectivement 91 % pour les femelles et 84 % pour les mâles de la variabilité de nos données et sont donc de bonne qualité (**Figure 21**). Pour les mouches des deux sexes, les traitements se répartissent en trois groupes distincts (**Figure 21 - a et c**) : les CS, les J1 et un groupe formé par les J5 et J5 + cVA.

La position relative des traitements pré-imaginaires est similaire et symétrique. Ainsi, un axe permet de discriminer les individus CS des trois autres traitements d'exposition et le deuxième de ségréger la réponse des groupes pondus à 5 jours (J5 et J5 + cVA) des CS et J1 (**Figure 21 - a et c**). Les groupes J5 et J5 + cVA sont quasiment confondus et les réponses des trois groupes formés (CS, J1 et J5/J5+cVA) sont indépendantes.

Pour les deux sexes, les J5 et J5 + cVA se rapprochent par leur amplitude de dépolarisations aux plus grandes doses de cVA (300 et 500 µg) (**Figure 21 - b et d**). Les CS se distinguent principalement par leur vitesse de repolarisation lors de l'exposition aux odorants contrôles et au cVA à la dose de 100 µg. Les J1 des deux sexes, quant à eux, sont caractérisés par leur amplitude de dépolarisation lorsqu'exposé au cVA à 1 µg. Les femelles J1 sont aussi caractérisées par leur vitesse de repolarisation face à l'hexane ou face à la dose la plus faible de cVA, alors que les mâles J1 le sont par l'amplitude de dépolarisation lorsqu'exposé au cVA à 100 µg.



**Figure 21** – Analyses factorielles discriminantes des variables pertinentes mesurées par électroantennographie sur femelles (**a** et **b**) et mâles (**c** et **d**) *D. melanogaster* CS, J1, J5 et J5 + cVA. Les traitements pré-imaginaux, utilisés comme individus, sont discriminés sur la base de leur réponse antennaire aux 4 odorants contrôles et aux 5 doses de cVA. Ces variables sont représentées dans les cercles de corrélations associés (**b** et **d**). Les représentations des expériences pré-imaginale sont délimitées par ellipses de confiance à 95%.







Chez les Arthropodes, la détection de sources odorantes leur permettant de localiser nourritures, abris, partenaires sexuels ou dangers et ainsi favoriser leur survie est un enjeu majeur (**Wilson, 1988**).

On retrouve dans quasiment tous les ordres d'insectes la recherche de partenaires sexuels associée à l'utilisation de phéromones d'agrégation. Celles-ci attirent mâles et femelles sur des lieux d'alimentation communs et ainsi favorisent leur rencontre (**Wertheim et al., 2005**). On observe fréquemment une synergie entre ces phéromones d'agrégation et l'odeur du substrat sur lequel elles sont déposées, comme chez le diptère *Toxotrypana curvicauda* (**Landolt et al., 1992**), voire un effet multiplicatif comme chez le coléoptère *Rhyzopertha dominica* pour qui l'attractivité des phéromones d'agrégation mâles est triplée en présence d'odeur de plante hôte (**Bashir et al., 2001**) ou chez le lépidoptère *Trichoplusia ni* pour qui elle est quadruplée (**Landolt et al., 1994**). Ce phénomène peut aller jusqu'à une réponse à la phéromone d'agrégation uniquement si celle-ci est couplée aux odeurs émanant de la nourriture (**Landolt, 1997 ; Wertheim et al., 2005**).

Chez *Drosophila melanogaster*, la communication phéromonale se fait majoritairement au moyen des hydrocarbures cuticulaires et du cis-vaccényl acétate, phéromone lipidique produite dans le bulbe éjaculateur du mâle (**Auer & Benton, 2016 ; Billeter & Wolfner, 2018**). Leur dépôt conjoint sur la nourriture, véritable signature chimique de l'espèce (**Keeseey et al., 2016**), attire mâles et femelles conspécifiques et favorise accouplements et comportements collectifs (**Bartelt et al., 1985**).

En plus d'agir à distance comme phéromone d'agrégation lorsqu'il est associé à des odeurs de nourritures, le cVA agit de plus comme phéromone anti-aphrodisiaque à courte distance en présence d'HC femelles. Son transfert du mâle à une femelle pendant l'accouplement conduit ainsi au rejet de celle-ci lors de rencontres avec d'autres mâles (**Ejima, 2015 ; Laturney & Billeter, 2016**).

Initialement décrite comme stéréotypée, innée et immuable (**Wyatt, 2010**), il a récemment été montré que la réponse aux phéromones pouvait cependant être plastique et dépendre notamment de l'expérience juvénile d'un individu.

Les travaux d'**Everaerts et al., (2018)** sur la Drosophile ont prouvé que la réponse adulte au cVA nécessitait un premier contact avec la phéromone pendant une fenêtre de temps précise du stade larvaire précoce (i.e. imprégnation phéromonale). En outre, la quantité de cVA transmise des femelles à leurs œufs



diminue avec les jours post-accouplement et les larves issues d'œufs pondus à des jours différents ne subissent pas la même expérience pré-imaginale à la phéromone.

Dans ce contexte, j'ai étudié le phénomène d'empreinte au cVA à travers l'étude du rôle agrégatif de la phéromone chez des individus dont l'imprégnation a été manipulée. Deux échelles de la détection de la phéromone ont été explorées : comportementale puis électrophysiologique.

La première échelle avait pour but d'étudier l'attractivité de nourritures marquées et enrichies naturellement ou artificiellement en phéromones au moyen d'un tunnel de vol. Cette première expérience a fait, de plus, l'objet d'une analyse d'espace de tête visant à étudier la nature et l'origine des odorants émis par les nourritures utilisées.

La deuxième échelle avait pour but d'étudier la réponse antennaire de mâles et femelles imprégnés ou non au cVA lors de la détection à courte distance de la phéromone.

## **I – Composés odorants de nourritures marquées par des Drosophiles**

### **Principales sources odorantes**

Dans l'environnement naturel des Drosophiles, les levures font partie intégrante du cycle de vie de l'insecte : elles sont ingérées par les larves de premier stade et résistent à la métamorphose (**Bakula, 1969 ; Ridley et al., 2012, 2013**). Les levures sont échangées entre mâles et femelles pendant l'accouplement et sont finalement réintroduites dans le substrat alimentaire à travers la ponte et les fèces, et par frottements cuticulaires (**Gilbert, 1980; Keesey et al., 2016**). Ces dépôts peuvent de plus permettre aux Drosophiles d'augmenter leur *fitness* en modifiant la communauté de microorganismes présente dans leur environnement et d'enrichir le microbiote des futures générations (**Anagnostou et al., 2010 ; Becher et al., 2012 ; Stamps et al., 2012**).

Insectes et levures sont ainsi associés en interactions mutualistes où l'insecte adulte sert de vecteur de dispersion et où sa larve facilite l'établissement de colonies en exploitant la nourriture. Les levures, elles, fournissent en retour les nutriments nécessaires à la croissance de l'insecte et lui indiquent olfactivement des lieux propices à sa ponte et à son alimentation (**Cha et al., 2012 ; Ganter, 2006 ; Stefanini, 2018**)

par émission d'un bouquet odorant caractéristique de nourritures fermentées (**Del Giudice et al., 2008 ; Helletsgruber et al., 2017 ; Huang et al., 2003 ; Junker & Tholl, 2013 ; Peñuelas et al., 2014 ; Schulz & Dickschat, 2007**).

Dans un contexte simplifié (mes expériences), 3 sources principales d'odorants peuvent-être citées :

- Les Drosophiles, par dépôt passif de leurs hydrocarbures et possible dégradation de ceux-ci par le microbiote,
- La nourriture, contenant entre autres, des levures inactivées et les produits de dégradation de celle-ci,
- Les micro-organismes, introduits par les Drosophiles à travers leurs fèces et cuticules.

### **Attractivité des nourritures marquées**

Mes résultats montrent étonnement qu'en absence de nourriture, les profils odorants des mâles et femelles *D. melanogaster* sont confondus, ceux des mâles et femelles *simulans* sont largement discriminables.

Après ajout de nourriture cependant, les mâles *melanogaster* et les femelles *simulans* s'isolent, alors que femelles *melanogaster* et mâles *simulans* se confondent.

En présence de nourriture, il semblerait que les mâles *melanogaster* s'isolent par la présence majoritaire d'odorants d'origine bactérienne (acides isovalériques, hexanoïques et isobutyriques, éthanal, acétoïne et éthyle butyrate) et provenant des levures (acide hexanoïque, acétoïne, éthyles butyrates, hexanoates et 9-décénoates) (**Becher et al., 2012 ; Beck et al., 2002 ; Farine et al., 2014 ; Palanca et al., 2013 ; Ryu et al., 2004**).

Ceci pourrait être dû à une différence entre les microbiotes cuticulaires et/ou intestinaux abrités par les mâles *melanogaster* et introduits par ceux-ci dans leur nourriture, et ceux associés aux femelles *melanogaster* et aux *D. simulans* des deux sexes. Ces micro-organismes en dégradant différemment la nourriture et à travers leur métabolisme pourraient en effet émettre des odorants discriminants.

Les mâles *melanogaster* sont connus pour allouer leur temps différemment que les femelles sur la nourriture et rester plus souvent en contact avec celle-ci lorsque d'autres individus sont présents (**Wertheim et al., 2006**).

Il est donc aussi possible que les mâles dégradent plus efficacement la nourriture car s'alimentent davantage et/ou rejettent plus de fèces chargées en

micro-organismes. Cette hypothèse est cependant nuancable : les femelles s'alimentant plus en levures que les mâles et les deux sexes déféquant à la même fréquence (**Edgecomb et al., 1994; Vargas et al., 2010**).

En tunnel de vol, il est envisageable que le marquage *Mâle CS* émette conjointement des odorants produits par les micro-organismes introduits par les mâles *D. melanogaster* dans la nourriture et des phéromones mâles (notamment le cVA). Ces composés, pouvant entrer en synergie au niveau du système nerveux central des individus testés en vol (**Das et al., 2017**), pourraient expliquer la forte attractivité de la nourriture *Mâle CS* pour les mâles et femelles J1 qui en sont naturellement imprégnés.

En analyses d'espaces de tête, les odeurs de *Fem CS* + nourriture ne se distinguent pas des odeurs de nourriture seule, rejoignant les résultats de **Farine et al., (2012)** qui n'observe quasiment aucun HC volatils émanant des femelles.

Ce faible taux d'HC femelles détecté pourrait s'expliquer par leur très faible volatilité (**Auer & Benton, 2016**) ou être dû à leur dégradation. **Lebreton et al., (2017)** met notamment en évidence l'existence d'un produit d'oxydation de l'hydrocarbure cuticulaire femelle 7,11-heptacosadiène (7,11HD) en (*Z*)-4-undécénal (abrégée en Z4-11Al) dans les espaces de tête des femelles. Ce composé agirait comme phéromone d'agrégation pour les deux sexes (sa détection à distance étant concomitante à celle de (*R*)-linalol issu de la nourriture) et comme modulateur de parades chez les mâles déjà accouplés (**Borrero-Echeverry et al., 2022**).

En tunnel de vol, le potentiel attractif du marquage *Fem CS* n'est cependant pas vérifié dans mes expériences. En effet, même si les mâles J5+cVA sont les seuls à réaliser un choix significatif dans le choix *Mâle CS/Fem CS*, les mâles J1 ainsi que les femelles J1 et J5 semblent tout de même davantage attirés par la nourriture *Mâle CS*. En outre, mâles et femelles testés ne choisissent jamais la nourriture *Fem CS* lorsqu'elle est opposée à une nourriture *PF*, quel que soit leur traitement pré-imaginal. Ils présentent de plus les latences d'envol les plus longues lorsque ce choix est proposé (**Cazalé-Debat et al., 2019**).

Les analyses d'espaces de tête des individus *simulans* montrent un isolement du profil odorant des femelles en absence et présence de nourriture. Sachant que les mâles *melanogaster* et mâles et femelles *simulans* partagent plusieurs similitudes de profil cuticulaire (forts taux de 7T et faibles taux de 7,11HD et 7,11ND) (**Sharma et al., 2012**), il reste envisageable que les différences de volatiles prélevés s'expliquent

par des différences de microbiotes introduits dans la nourriture entre les femelles *simulans* et les mâles des deux espèces.

En vol, *D. melanogaster* est capable de différencier deux sources odorantes physiquement proches par réception asynchrone des molécules en émanant (**Sehdev et al., 2019**). Les profils des nourritures *Mâle CS* et *Fem sim* étant finalement les deux les plus isolés, il est possible que les mêmes fréquences d'atterrissage des mâles pour les choix de nourritures *Mâle CS/PF* et *Mâle sim/Fem sim* s'expliquent par la présence, dans ces deux choix, de marquages facilement discriminables à distance.

### Sources de variabilité en tunnel de vol

Plusieurs éléments techniques et protocolaires peuvent-être discutés car introduisant des biais dans la qualité des marquages employés en tunnel de vol.

Premièrement, les mâles et femelles utilisés pour marquer les milieux utilisés en tunnel de vol ont été groupés par 20 dès l'émergence de leur puppe. En étudiant la nature et quantité d'HC et de cVA déposés sur leur nourriture et émis dans l'air par des *Drosophiles* après un contact social, **Farine et al., (2012)** a observé que le groupement de mâles pendant les premières heures de leur vie adulte n'impactait pas leur quantité de cVA produit mais conduisait par contre à une diminution importante de leur 5-T, 7-T, 9-T et une augmentation du n-tricosane émis dans l'air et/ou déposé sur le substrat, certainement en réponse aux agressions fréquentes entre eux. Il est donc certain que le groupement des individus marqueurs dans mes expériences a impacté leur profil volatile en amont des tests en tunnel.

Deuxièmement, le marquage *Fem CS + cVA* représente fictivement le dépôt réalisé par des femelles accouplées. Cependant je n'ai pas utilisé de vraies femelles accouplées car elles auraient introduits dans la nourriture une dose variable de cVA ainsi que des HC, Acp et micro-organismes hérités des mâles (**Everaerts et al., 2018**).

Enfin, à l'atterrissage d'une *Drosophile* sur une des deux plateformes proposées pendant les tests, les nourritures n'étaient pas éliminées. Il est possible que les quelques minutes servant à écarter la mouche atterrie soient suffisantes pour qu'elle dépose des odeurs supplémentaires par simple frottement, en déféquant ou en s'alimentant.

## II - Facteurs modulant l'attraction au cVA

### Dimorphisme sexuel d'attraction au cVA

Dans notre étude, les femelles J1 sont attirées par le cVA, qu'il soit accompagné d'HC mâles (marquage *Mâle CS*) ou d'HC femelles (marquage *Fem CS + cVA*). Les mâles, eux, préfèrent significativement le cVA en présence d'HC mâles (marquage *Mâle CS*). Cette différence de comportement entre femelles et mâles J1 peut se justifier par la différence de nécessité de répondre à la phéromone entre sexes.

Pour les femelles, répondre positivement aux dépôts conjoints de cVA et d'HC mâles CS ou femelles CS (résultats qui rejoignent ceux de **Cazalé-Debat et al., (2019)**), leur assure de rejoindre des environnements regroupant des mâles et des femelles récemment accouplées et donc de potentiels partenaires. **Mercier et al., (2018)** propose d'ailleurs l'hypothèse que les gouttelettes fécales des mâles, riches en cVA, seraient activement déposées par ces derniers afin d'attirer les femelles dans des zones désignées et ainsi augmenter leur chance de s'accoupler. La présence de cVA et d'HC mâles et le comportement d'agrégation des femelles en réponse à ces dépôts leur fournirait ainsi un moyen de rencontrer plusieurs mâles et d'optimiser leur recherche de partenaire de qualité (**Kokko, 1997**).

Pour les mâles, la phéromone est significativement attractive chez les individus imprégnés, naturellement ou non, mais uniquement lorsqu'accompagnée d'HC mâles CS. La réponse positive de mâles aux odeurs de conspécifiques de même sexe est observable chez plusieurs espèces de mouches de fruits dont *D. conformis* (**Shelly, 1990**), *D. mycetophaga* (**Aspi & Hoffmann, 1998**) et *C. capitata* (**Shelly, 2001**). En se regroupant, la théorie du signalement (**Otte, 1974**) prédit en effet que les mâles émettraient un signal plus intense, durable et sur une plus grande distance qu'en étant isolés et favorisant l'attraction de femelles (**Droney, 1994**). Selon la théorie de la préférence femelle, les groupes de mâles les plus denses seraient de plus davantage visités par les femelles car elles y évalueraient plus efficacement la qualité de potentiels partenaires en les comparant, favorisant le maintien de ce comportement chez les mâles (**Kokko, 1997**).

Lorsque le cVA est accompagné d'HC femelles CS (marquage *Fem CS + cVA*), l'attraction des mâles est moins marquée que celle des femelles. Cette perte d'attractivité, en accord avec **Cazalé-Debat et al., (2019)**, pourrait témoigner d'une réponse différente entre mâle et femelles due à des effets spécifiques aux sexes de l'imprégnation (**Everaerts et al., 2018**). Il est de plus possible que le cocktail « cVA + HC femelle CS », avant d'être un anti-aphrodisiaque de contact pour les mâles (**Clowney et al., 2015b**), agisse d'abord à distance en limitant leur approche vers des environnements riches en femelles accouplées.

### **Imprégnations et pertinences écologiques**

**Immelmann (1975a)** propose une classification des imprégnations selon leur pertinence écologique, et qualifie ainsi les imprégnations alimentaires et de lieu de vie d'imprégnations « écologiques », et l'imprégnation sexuelle de « non-écologique ». Les imprégnations écologiques posséderaient des avantages sur la rapidité avec laquelle une nouvelle génération pourrait s'approprier un environnement et des ressources jusqu'alors inexploitées par ses parents, tout en se spécialisant sur un type unique de ressource (exemples de populations mosaïques : **Djipto-Lordon & Dejean (1999)** ; **Sorenson et al., (2003)** ; **Yang et al., (2018)**).

Toujours selon **Immelmann (1975a)**, la plasticité comportementale relevant d'une différence d'imprégnation entre individus favoriserait l'espèce dans son ensemble. Les individus imprégnés adhèrent en effet fidèlement à leur environnement et remplissent efficacement les conditions écologiques de leur niche. A l'inverse, les individus non imprégnés représentent un « *pool* » d'individus capables de coloniser de nouvelles niches : de la même manière que des individus non-spécialistes, ils seraient avantagés dans un environnement changeant ou dans une zone marginale de l'aire de distribution de l'espèce.

En accord avec ces prédictions, les femelles J5 de notre étude ne sont pas attirées par le cVA, qu'il soit accompagné d'HC mâles ou femelles.

En nature, il est donc possible que des femelles non-imprégnées (comme nos J5) visitent principalement des environnements avec peu ou pas de congénères. Par voie de conséquences, elles seraient moins sujettes aux tentatives d'accouplements répétées des mâles et subirait ainsi une pression d'alimentation, d'accouplement et de ponte relativement faible (**Wertheim et al., 2006**).

En contrepartie, il est prédit par effet Allee que la faible densité d'adultes présents sur le substrat entraîne plusieurs conséquences négatives sur le succès des descendants (**Wertheim et al., 2002**). En ne s'agréant pas pour pondre, les femelles ne ramolliraient pas assez la nourriture, n'introduiraient pas assez de micro-organismes et ne réduiraient pas assez efficacement le développement de champignons délétères pour assurer l'implantation et la survie des larves.

En outre, une faible densité de larves ne dégraderait pas assez le substrat, limiterait l'implantation de levure et la fermentation de la nourriture (**Etienne et al., 2002 ; Wertheim et al., 2002**), en plus d'augmenter le risque individuel d'être parasité (**Hamilton, 1971**).

A l'inverse des femelles, les mâles J5 sont tout de même attirés par le marquage « mâles CS », bien qu'ils ne soient pas imprégnés au cVA.

Il est possible que ce comportement témoigne de l'utilisation d'autres indices chimiques que le cVA dans leur orientation (**Cazalé-Debat et al., 2019**) et qu'ils s'agrègent tout de même dans la nature en utilisant la volatilité des HC de faibles poids moléculaires (5-T, 7-T, 9-T) (**Farine et al., 2012 ; Lin et al., 2015**).

Leur absence d'imprégnation au cVA pourrait cependant se répercuter négativement sur leur succès reproducteur. Premièrement, il est possible qu'ils n'interprètent pas les signaux émis par des mâles conspécifiques et soient moins agressifs que leurs concurrents (**Liu et al., 2011**). Deuxièmement, en n'utilisant pas le cVA pour repérer les femelles déjà accouplées, il est possible qu'ils perdent temps et énergie à parader des femelles non réceptives (**Ejima et al., 2007**).

En outre, la prédisposition des mâles à préférer la nourriture enrichie en HC des *Mâles sim* est significative chez les mâles J5, il y aurait donc amplification de l'attractivité de marquage hétérosécifique chez les mâles *melanogaster* non imprégnés au cVA. Un des avantages de l'imprégnation sexuelle est en effet de reconnaître ses conspécifiques dans un groupe dont l'apparence évolue dans un court laps de temps (**Immelmann, 1975a**), par exemple en situation de sympatrie, et ainsi éviter les erreurs d'accouplement (**Irwin & Price, 1999**). L'imprégnation sexuelle se retrouve ainsi chez des espèces reconnues pour leur grande capacité d'extension et dont les aires de répartition se recoupent avec des espèces au phénotype proche (exemples chez les Gallinacés, Cichlidés, Fringillidés **Grant & Grant (2018) ; Verzijden & Cate, (2007)**).

Bien qu'aucune conclusion ne puisse être formulée quant aux possibles erreurs d'accouplements hétérospécifiques des mâles non imprégnés au cVA, il est envisageable que la synergie d'imprégnation au cVA et aux profils d'HC propres à *D. melanogaster* facilite leur reconnaissance d'un partenaire approprié dans la guildes de Drosophiles s'alimentant sur les fruits en décomposition.

### **Limites de l'imprégnation synthétique au cVA**

Dans notre étude, l'imprégnation manuelle des mâles et femelles J5+cVA testés en vol ne semble pas rétablir pleinement l'imprégnation à la phéromone.

En échouant à restaurer l'effet anti-aphrodisiaque du cVA chez des mâles issus d'œufs pondus à J1, déchorionnés puis placés dans une nourriture artificiellement enrichie en cVA, **Everaerts et al., (2018)** en est venu aux conclusions que les quantités de cVA introduites artificiellement pouvaient être trop différentes des quantités naturellement présentes dans l'environnement larvaire ou que l'imprégnation nécessitait la détection conjointe de cVA et d'autre(s) facteur(s) transmis aux œufs les premiers jours de ponte afin d'être efficace.

Ces facteurs, pouvant être des HC d'origine maternelle et/ou paternelle (**Narasimha et al., 2019**) ou tout autre composé produit par les microbiotes des adultes, imprègnent certainement les larves à leur émergence de manière sexe spécifique. La diminution d'HC présents sur les œufs dont sont issus les J5+cVA pourrait expliquer la grande variabilité des choix effectués par les mâles et femelles testés en vol ; par exemple le fait que les mâles J5+cVA ne sont attirés par la nourriture *Mâle CS* que lorsque celle-ci est opposée à la nourriture *Fem CS* ou le fait que l'attraction au cVA n'est rétablie chez les femelles J5+cVA que lorsque la phéromone est associée aux HC femelles (marquage *Fem CS + cVA*).



### III - Détection et intégration du cVA

Il est possible que les différences de comportement d'attraction au cVA entre sexes et entre traitements d'exposition s'expliquent aussi par une différence de détection de la phéromone.

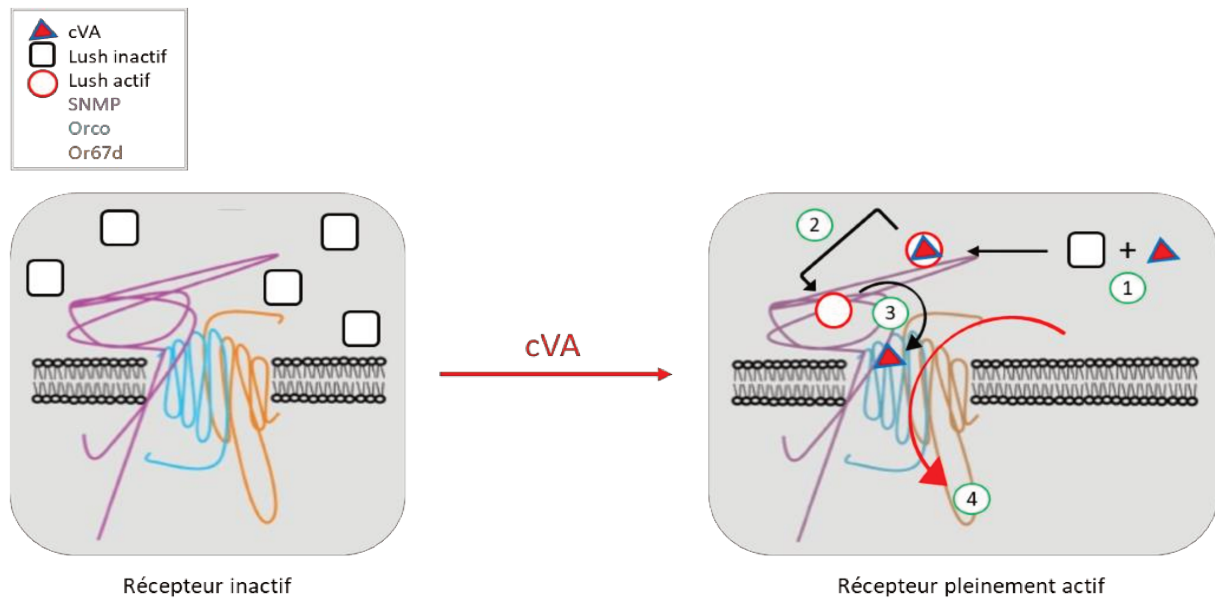
#### Réception périphérique du cVA

A l'échelle sensillaire, la détection du cVA par les récepteurs dédiés nécessite le concours de l'OBP Lush, sécrétée dans la lymphe de toutes les sensilles trichoïdes par leur cellules accessoires thécogènes et trichogènes (**Shanbhag et al., 2005 ; Xu et al., 2005**). En plus d'être impliquée dans la détection et l'évitement chimio taxique des Drosophiles envers de trop fortes concentrations d'alcool (**Kim et al., 1998**), l'OBP Lush s'est révélée à la fois nécessaire dans le fonctionnement normal des sensilles T1 et la détection du cVA dans les sensilles T1 et T3.

**Laughlin et al., (2008)** a élucidé le mode de fonctionnement de l'OBP par cristallographie : la formation d'un complexe Lush – cVA modifie la conformation de l'OBP par un ensemble de réarrangements d'acides aminés (éjection d'une phénylalanine 121 hors du site de liaison du cVA, causant la cassure d'un pont salin entre l'aspartate 118 et la lysine 87 et finalement faisant basculer la boucle C - terminale de l'OBP vers l'extérieur), la faisant passer d'une conformation inactive à active (**Sengupta & Smith, 2014**).

Un quatrième élément, identifié par (**Jin et al., 2008**) et appartenant à la famille des protéines CD36, s'est aussi révélé nécessaire à la réception du cVA : une protéine de membrane de neurone sensoriel (SNMP). La production de mutants *snmp* et l'injection de sérum anti-SNMP dans la lymphe des sensilles T1 déclenche l'insensibilité des deux phénotypes au cVA (**Benton et al., 2007 ; Jin et al., 2008**).

**Sengupta & Smith (2014)** ont finalement proposé un modèle dans lequel le SNMP constituerait un relai entre Lush et le neurone sensoriel : en l'absence de cVA, le SNMP maintiendrait le neurone à un stade inactif. L'interaction du cVA avec Lush modifierait ensuite sa conformation (la rendant active) et permettrait sa ligation au SNMP, levant l'inhibition du canal ionique Or67d/Or83b. La libération du cVA par Lush à la suite de cette ligation activerait complètement le récepteur (**Figure 22**).



**Figure 22** – Modèle de détection du cVA par les récepteurs 67d (adapté de **Sengupta & Smith, 2014**). L’OBP Lush fixe le cVA et devient active (1). En se liant au SNMP, Lush permet l’ouverture du canal ionique Or67d/Or83b (2). Finalement, la libération du cVA par Lush (3) active pleinement le récepteur (4).

### Dimorphisme sexuel de réception du cVA

Chez *D. melanogaster*, un dimorphisme sexuel de la densité antennaire en sensilles trichoïdes est observable sur le funicule, avec un nombre supérieur de sensilles chez les mâles (**Xu et al., 2005**). En plus des éléments cités en **Figure 22**, l’environnement péri-récepteur des sensilles trichoïdes admet lui aussi des différences entre sexes, avec une expression en enzymes de dégradation d’odorants (estérase-6) supérieure chez le mâle (**Chertemps et al., 2012**) et une seconde OBP (OBP69a) impliquée dans le transport du cVA inversement régulée entre mâle et femelle suite à un contact avec la phéromone (**Bentzur et al., 2018**).

Mes résultats ne montrent cependant pas de différences de réponses électrophysiologiques antennaires au cVA entre sexes (cohérent avec les observations de **Kurtovic et al., (2007)**), ce qui suggère que les différences comportementales (notamment celles observées en tunnel de vol) proviendraient non pas d’un dimorphisme de la détection périphérique du cVA mais plutôt d’une intégration différente de l’information dans les centres olfactifs supérieurs.

### Dimorphisme sexuel d’intégration centrale du cVA

Le dimorphisme de comportement sexuel chez *D. melanogaster* est sous contrôle du gène pléiotrope *fruitless (fru)*,

dont l'épissage en isomorphe mâle FruM, strictement confiné aux neurones mâles (**Lee et al., 2000**) est nécessaire et suffisant pour déclencher la parade mâle hétérosexuelle et inhiber la parade homosexuelle (**Billeter et al., 2006**). Chez les femelles, son épissage alternatif en FruF rend la protéine inactive (**Heinrichs et al., 1998 ; Lee et al., 2000**). L'inactivation de FruM chez les mâles abolit leur comportement de parade et l'épissage forcé de *fru* en FruM chez des femelles fait apparaître chez elle les premières étapes de parade mâle face à d'autres femelles (**Manoli et al., 2005**).

La présence de FruM agissant comme facteur de transcription avec la protéine Doublesex modifie la structure des neurones l'exprimant, tels que les neurones P1 (régulant sommeil et activité sexuelle) (**Chen et al., 2017 ; Clowney et al., 2015 ; Kimura et al., 2008**) ou les neurones du cluster [*fru+*] du lobe antennaire médian (**Kimura et al., 2005**).

D'autres neurones du système nerveux adulte expriment FruM et sont impliqués dans la circuiterie de codage des informations olfactives et gustatives phéromonales. Ces neurones sont les ORN portant les récepteurs Ir84a, Or47b et Or67d ainsi que leurs neurones de projections (PN) associés. Les ligands respectifs de ces trois récepteurs sont l'acide phénylacétique, le cVA et le méthyl laurate (**Dweck et al., 2015 ; Grosjean et al., 2011**), et les 3 glomeruli recevant ces informations sont plus larges chez les mâles que chez les femelles (respectivement VL2a, VA1v et DA1) (**Stockinger et al., 2005**).

Pour le cVA, *fru* est de plus exprimé dans tous les neurones de la circuiterie de transduction du message chimique en message moteur, des ORN jusqu'aux neurones responsables du comportement de parade (**Lee et al., 2000**). Les réponses électrophysiologiques des ORN et PN mâles et femelles répondant au cVA sont similaires (**Datta et al., 2008 ; Kurtovic et al., 2007**), suggérant que la différence comportementale sexuelle de réponse au cVA serait codée par des différences de circuiterie au-delà des lobes antennaires.

**Cachero et al., (2010)** identifia 5 clusters des projections axonales des PN de DA1 faisant relais dans la corne latérale dont 2 sexuellement dimorphes : les clusters aSP-f et aSP-g.

Chez les mâles les axones des PN répondant au cVA chevauchent exclusivement les dendrites des neurones aSP-f, alors qu'ils chevauchent les dendrites des neurones aSP-g chez les femelles (**Cachero et al., 2010**) et les faibles latences de réponse entre DA1 et ces deux clusters suggèrent une connexion monosynaptique (**Kohl et al., 2013**).

Chez les femelles, les neurones asP-g ont un spectre large de reconnaissance d'odorants et répondent au cVA et aux odeurs issues de la nourriture telle que celle de vinaigre, alors que les neurones asP-f des mâles répondent exclusivement au cVA (**Kohl et al., 2013**). Ces projections sexuellement dimorphes, dues à la présence de FruM (**Cachero et al., 2010**), font finalement de *fruitless* un bon candidat dans l'explication d'une différence de comportement d'agrégation entre mâle et femelle en présence de nourritures et de cVA (**Kohl et al., 2013**).

### **Plasticité de la réponse périphérique à un odorant**

Les ACP effectuées entre traitements d'exposition sur les amplitudes de dépolarisations et les vitesses de repolarisations montrent que la présentation de cVA pendant la période pré-imaginale d'un individu s'accompagne d'une plasticité de la sensibilité périphérique à la phéromone au stade adulte. Cette plasticité étant similaire entre mâles et femelles avec les réponses des CS et des J1 indépendantes entre-elles et avec celles des J5 et J5+cVA, ces dernières étant confondues.

Les principales informations sur la modulation d'une réponse électrophysiologique adulte à un odorant nous viennent de l'abeille, chez qui l'amplitude de réponse est dépendante du stade de développement exposé et de la méthode d'exposition :

- Une exposition pupale continue pendant 9 jours consécutifs au linalol et au phényl acétaldéhyde n'engendre pas de variation de réponse antennaire adulte (**Sandoz et al., 2000**).
- Une exposition adulte engendre des résultats plus contrastés. Le conditionnement d'individus aux odeurs de violette ou de fenouil après plusieurs cycles récompensés de sucrose se traduit par une augmentation de réponse antennaire (**de Jong & Pham-Delègue, 1991 ; Wadhams et al., 1994**). Le conditionnement au linalol et à l'acide 9-oxo-décénoïque après plusieurs cycles récompensés, ou au linalol et au phényl-acétaldéhyde par exposition constante d'individus pendant les 8 premiers jours suivant l'émergence pupale, entraîne une diminution de réponse (**Claudianos et al., 2014; Sandoz et al., 2000**).

Le conditionnement à l'hexanol, au géraniol, au linalol ou à l'acétate d'isoamyle après plusieurs cycles récompensés n'a aucun impact sur la réponse antennaire du même stade (**Bhagavan & Smith, 1997 ; Sandoz et al., 2001**).

- Une exposition larvaire enfin, par conditionnement pré-imaginal olfactif de larves s'alimentant de sucre parfumé d'1-hexanol, s'accompagne d'une diminution de réponse périphérique à l'odorant chez l'abeille adulte (**Ramírez et al., 2016**).

Chez *D. melanogaster*, **Devaud et al., (2003)** a montré que la présentation prolongée de benzaldéhyde à des femelles pendant leur période critique adulte (les 5 premiers jours qui suivent l'émergence hors de leur puppe) s'accompagnait d'une modification de volume du glomérule impliqué dans la reconnaissance de l'odeur, mais ne provoquait aucune modification de leur réponse EAG (**Devaud et al., 2001**).

Ces travaux se distinguent cependant par la méthode de présentation des odorants, le contexte dans lequel se fait l'apprentissage odorant étant en effet questionné par **Sandoz et al., (2000)** et **Devaud et al., (2001, 2003)**. Les auteurs font la différence entre l'effet d'une exposition passive à une odeur continuellement présente pendant que l'animal se nourrit, et l'effet d'un conditionnement positif par associations brèves entre odeur et récompense alimentaire. Le premier cas, dépendant des expériences naturelles de fourragement de l'animal, se qualifie de contexte instrumental et correspond à un mécanisme non-associatif proche de l'habituation.

Par analogie, les différences observées entre J1 et J5 pourraient être dues à un cas d'adaptation sensorielle par exposition prolongée au cVA en contexte instrumental des J1 se traduisant par une modification de leur sensibilité périphérique adulte aux doses de phéromone les plus faibles (vraisemblablement les plus pertinentes écologiquement). Le cVA étant de plus rencontré par la larve lorsqu'elle s'alimente, il est possible que le système gustatif soit impliqué dans sa détection et que la nourriture soit perçue comme une récompense.

La proximité des réponses EAG entre J5 et J5+cVA, qui sont elles aussi exposées péri-natalement à la phéromone mais ont une réponse différente des J1, nuance cependant cette hypothèse. Deux pistes peuvent-être explorées afin de tenter d'expliquer cette différence :

- (i) il est possible que le cVA seul et artificiellement introduit dans la condition J5+cVA ne suffise pas à rétablir pleinement l'imprégnation ou
- (ii) il est envisageable que

l'expérience juvénile des J5+cVA s'éloigne trop d'un schéma naturel de rencontre de la phéromone pour avoir un impact sur la qualité de réponse EAG une fois adulte.

Pour la première hypothèse (i) et comme discuté dans les « Limites de l'imprégnation synthétique au cVA », il est possible que la transmission conjointe de cVA avec d'autres composés maternels et/ou paternels pendant les premières pontes soit nécessaire afin de permettre la modulation de réponse adulte à la phéromone (**Everaerts et al., 2018**). En outre, il reste envisageable que la dose de cVA introduite soit trop forte ou trop faible par rapport aux doses naturellement rencontrées par les larves.

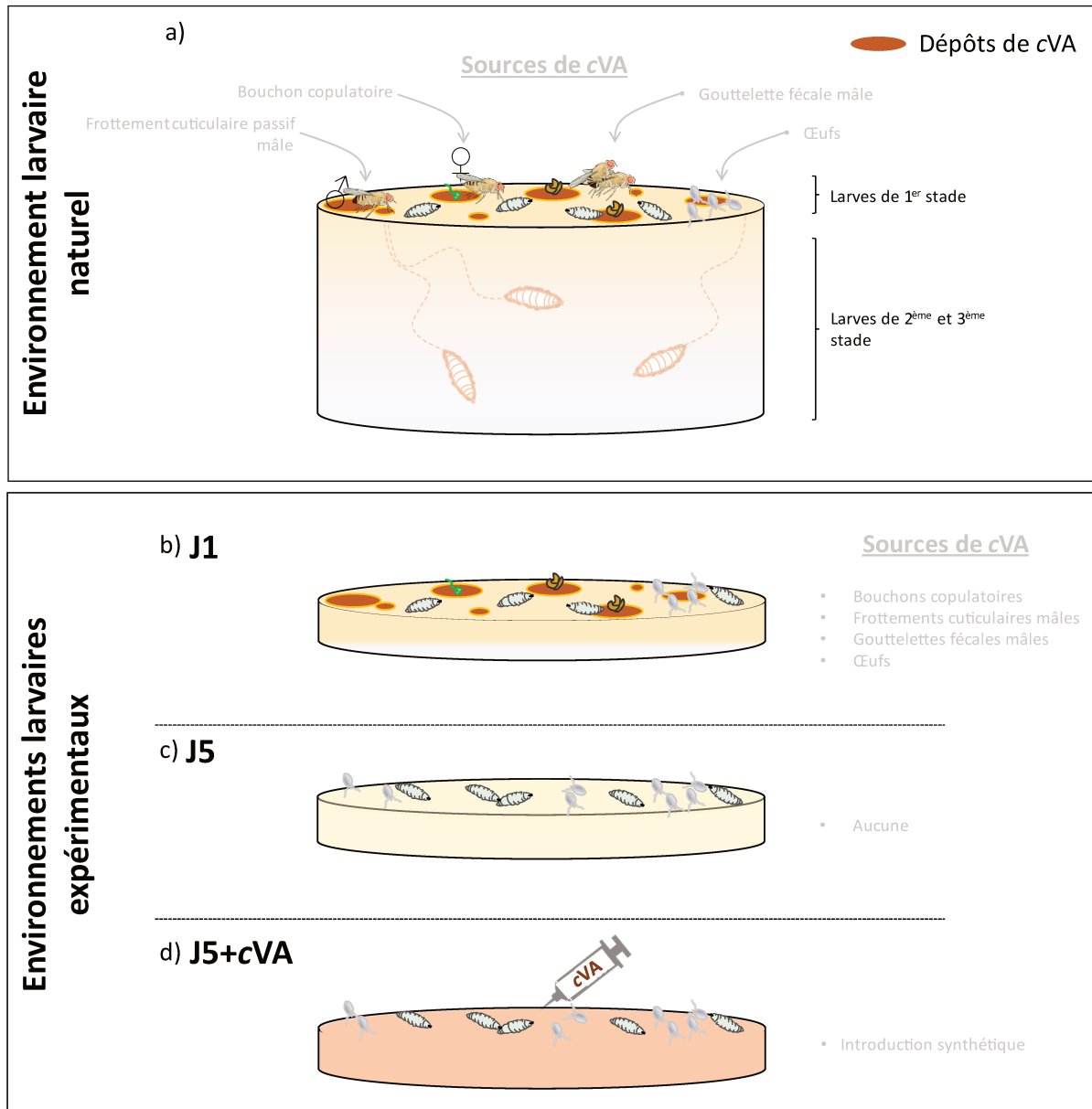
Pour la deuxième hypothèse (ii), en conditions naturelles, le cVA est déposé localement et superficiellement sur la nourriture et le substrat de rencontres des Drosophiles par les mâles à travers leurs frottements cuticulaires passifs ou leurs fèces (**Farine et al., 2012 ; Keesey et al., 2016 ; Mercier et al., 2018**) ; et par les femelles récemment accouplées via leurs premières pontes et l'éjection sélective du bouchon copulatoire (**Laturney & Billeter, 2016 ; Lung & Wolfner, 2001**). Ces différentes sources d'émission sont responsables d'une micro-distribution du cVA et font de l'environnement des Drosophiles un paysage dans lequel la répartition de la phéromone varie à la fois spatialement et temporellement (**Mercier et al., 2018 ; Wertheim et al., 2006**) (**Figure 23 - a**).

Les larves de 1<sup>er</sup> stade restant en surface (**Durisko et al., 2014**) seules les disparités en 2D de distribution de la phéromone sont discutées, mais il est bien sûr envisageable que les larves de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> stade, en explorant verticalement la nourriture communale, emportent avec elles du cVA prélevé à la surface et créent en plus une disparité en 3D de distribution.

### ***Distribution naturelle vs. synthétique du cVA***

Ces caractéristiques de dépôts du cVA en surface se retrouvent dans le traitement pré-imaginal des J1 (**Figure 23 - b**) qui sont en effet pondus sur de la nourriture manipulée par mâles et femelles et ayant ainsi reçu l'ensemble des dépôts responsables de la micro-distribution de la phéromone. A l'inverse, le traitement artificiel des larves J5+cVA ne présente pas cette hétérogénéité d'environnement : en changeant de tubes les femelles accouplées jusqu'à leur 5<sup>ème</sup> jour post-accouplement, aucun mâle n'a pu déposer ses phéromones par contact ou à travers ses fèces sur la

nourriture finale de ponte et les femelles avaient déjà éjecté bouchons copulatoires et cVA hérités de l'accouplement. Le cVA artificiellement introduit est de plus uniformément réparti car mélangé à la nourriture finale de ponte avant que celle-ci ne soit introduite (**Figure 23 - d**).



**Figure 23** – Représentation schématique des sources de cVA, responsables de la micro-distribution de la phéromone dans l’environnement naturel des larves de 1<sup>er</sup> stade de *Drosophila melanogaster* (a). Les larves pondues à J1 se retrouvent dans les mêmes caractéristiques de distribution (b). Les larves pondues à J5, à l’inverse, explorent un environnement dépourvu de cVA (c). Les larves J5+cVA se retrouvent dans un environnement saturé en cVA dans lequel la phéromone est uniformément répartie (d).

Cette différence de confrontation au cVA (environnement micro-distribué et sources hétérogènes vs. environnement homogène et source unique) pendant les premiers stades larvaires peut expliquer la différence de réponse entre J1 et J5+cVA. Au final, ce pourrait être l'enchaînement d'activations et d'inactivations des récepteurs périphériques de la larve à son émergence puis pendant les premières heures d'exploration de son environnement de surface qui seraient responsables de la qualité de réponse électrophysiologique des J1.

L'absence totale d'activation des récepteurs au cVA (J5) ou leur activation constante sans variations (J5+cVA) aurait le même résultat et conduirait à la même sensibilité périphérique à la phéromone, une fois l'individu adulte.



#### IV – Imprégnation au cVA

Cette partie présente les processus neuronaux pouvant être impliqués dans la détection périphérique du cVA chez la larve de *D. melanogaster* et les structures soutenant potentiellement le transfert d'une mémoire olfactive de la phéromone au stade adulte pendant la métamorphose.

##### Circuiterie neuronale olfactive chez la larve

Au niveau périphérique, les organes chimio-sensoriels larvaires se concentrent sur la tête de l'insecte, dans le complexe antenno-maxillaire et se composent des organes dorsaux, terminaux et ventraux ainsi que leurs ganglions associés (**Gendre et al., 2004**). L'organe dorsal abrite les terminaisons dendritiques de GRN et des seuls ORN de la larve. Les neurones innervant les organes terminaux et ventraux sont à l'inverse exclusivement gustatifs (**Vosshall & Stocker, 2007**).

Les ORN, au nombre de 21, se partagent les 25 Or identifiés de ce stade. L'ablation chimique des ORN de l'organe dorsal et l'inactivation du corécepteur Orco rend la larve totalement anosmique et altère sa chimiotaxie, indiquant que tous les Or sont coexprimés avec Orco et qu'aucun autre organe que l'organe dorsal n'assure la détection olfactive à ce stade (**Heimbeck et al., 1999; Larsson et al., 2004**).

Au niveau central, l'architecture olfactive est ensuite similaire entre adulte et larve, bien que plus simple chez cette dernière. Les 21 ORN arborisent dans les sensilles olfactives de l'organe dorsal et projettent leur axone dans 21 gloméruli des lobes antennaires larvaires (LAL) où ils font synapses avec 21 PN (**Fishilevich & Vosshall, 2005**). Deux types de PN sont identifiés chez la larve : les PN uni-glomérulaire (uPN) connectés à un unique ORN et les PN multi-glomérulaires (mPN) connectés à plusieurs ORN stéréotypés. Les LAL sont, comme chez l'adulte, le lieu de *cross-talk* entre gloméruli par l'action de LN GABAergiques à large spectre et connectant l'ensemble des gloméruli, et de LN GABA- ou glutamatergiques connectant un faible nombre de gloméruli (**Python & Stocker, 2002**). Les projections axonales des uPN et mPN convergent vers le tractus antenno-cérébral médian et projettent de manière stéréotypée vers une trentaine de gloméruli du calyx des corps pédonculés (*mushroom bodies* ; MB) dans lesquels ils font synapses avec les cellules de Kenyon (KC).

Deux modèles de synapses se rencontrent entre les PN et les KC dans les MB : les PN innervent de manière stéréotypée un voire deux gloméruli maximum du calyx, les KC en revanche arborisent soit dans un gloméruli du calyx, soit dans 6 gloméruli

et n'ont pas d'arborisations stéréotypées (**Masuda-Nakagawa et al., 2005**). Le premier cas (rapport 1 PN : 1 KC) permet le codage élémentaire des odeurs et l'activation des KC se ferait pas l'activation d'un unique PN. Dans le deuxième cas, le codage des odeurs apparaît combinatoire, chaque KC recevant ses *inputs* de plusieurs PN et faisant des KC des détecteurs de coïncidence (**Ramaekers et al., 2005**).

### **Hypothèses de réception du cVA chez la larve**

Dès le stade larvaire, *D. melanogaster* est considérée omnivore car peut exploiter et croître sur des nourritures dérivées de plantes ou d'animaux (**Yang, 2018**). La larve est en effet équipée d'un ensemble d'enzymes lui permettant de dégrader les carcasses d'insectes et, en laboratoire, les cas de cannibalismes des larves de 1<sup>er</sup> stade sur les œufs percés, sur les larves plus âgées et même sur les adultes sont fréquemment observables (**Gregg et al., 1990 ; Narasimha et al., 2019 ; Vijendravarma et al., 2013 ; Yang, 2018**). Afin de limiter la prédation des larves sur les œufs, ces derniers sont constitués d'une couche de cire riche en phéromones mâles et femelles (7-T, 7,11-HD, 7,11-ND et cVA) les masquant chimiquement et empêchant la fuite de leur contenu (**Narasimha et al., 2019**). Les larves, qui consomment leur œuf dès l'éclosion, entrent ainsi immédiatement en contact avec la couche de cire et donc les HC et cVA qu'elle contient. Ce contact correspondant finalement à la période critique présumée d'imprégnation à la phéromone (**Everaerts et al., 2018**).

Chez la larve cependant, aucun des deux Or impliqués dans la reconnaissance du cVA chez l'adulte (les Or65a et Or67d) ne sont présents (**Fishilevich et al., 2005**). Par ailleurs, **Cobb & Dannet (1994)** ont montré que les larves étaient extrêmement peu sensibles à distance au cVA, une faible attraction étant déclenchée par des doses de phéromone correspondant à plusieurs milliers de mâles adultes.

Un des défis majeurs soulevés par ces observations est ainsi d'identifier le(s) mécanisme(s) permettant la détection larvaire périphérique de la phéromone et responsable de l'imprégnation des individus. Il est envisageable :

- (i) Que la détection du cVA au stade larvaire soit réalisée par un (des) récepteur(s) olfactif(s) différent(s) de ceux permettant la détection adulte,
- (ii) Qu'un autre composé à la structure proche de celle du cVA soit détecté par le système olfactif larvaire,
- (iii) Que chez la larve, la réception du cVA se fasse par le système gustatif.

Pour la première hypothèse (i), les *Drosophiles* adultes détectent les 4 – ethylphenol et 4 – ethylguaiaicol, indicateurs de la présence d'antioxydants alimentaires, au moyen de leur récepteurs Or71a (**Dweck et al., 2015**). Les larves en sont dépourvues mais reconnaissent tout de même ces molécules à distance grâce à leur récepteur Or94a, abrité dans l'organe dorsal (**Dweck et al., 2015**). Il est donc concevable que larve et adulte reconnaissent les mêmes molécules volatiles à travers l'activation de différents récepteurs « stade-spécifiques ». Par analogie, il est envisageable que l'absence des Or65a et 67d au stade larvaire soit compensée par la présence d'autres Or reconnaissant le cVA et permettant tout de même l'imprégnation.

Dans ce cas de figure, la faible attraction des larves pour le cVA observée par **Cobb & Dannet (1994)** pourrait s'expliquer, comme pour l'éthanol, par une diminution de la sensibilité périphérique à la molécule causée par les contacts répétés avec celle-ci (**Cobb et al., 1992 ; Keeseey & Hansson, 2022**). Comme vu précédemment (**Figure 23**), l'enfouissement dans un substrat riche en cVA augmenterait ainsi le seuil de tolérance des larves à la phéromone et diminuerait drastiquement leur sensibilité à distance.

Pour la deuxième hypothèse (ii), il est envisageable que ce ne soit pas le cVA qui soit détecté par la larve mais un produit de sa dégradation agissant comme proxy de sa présence, comme cela a été montré avec l'acide hydroxycinnamique (antioxydants alimentaires) dont les larves détectent les produits (phénols) de dégradation par des levures (**Dweck et al., 2015**).

Chez les adultes, le cVA est naturellement dégradé en *cis*-Vaccenol (cVOH) par l'estérase-6 (Est-6), enzyme produite exclusivement dans le tractus génital et à la base des sensilles trichoïdes des mâles *D. melanogaster* (**Anholt & Williams, 2009; Sheehan et al., 1979**). Son action permet la désactivation du cVA après sa liaison avec ses récepteurs antennaires ou dans le tractus femelle après l'accouplement (**Chertemps et al., 2012 ; Sheehan et al., 1979**).

L'Est-6 fait partie d'une famille multigénique de carboxylestérases qui comprend notamment les estérases homologues 4, J et 7, respectivement présentes à la surface du tégument des larves de *Drosophila mojavensis*, *D. arizonensis*, *D. mulleri*, *D. arizonae*, *D. navojoa*, *D. aldrichi* et *D. wheeleri* (pour l'Est-4), *D. buzzatii* (pour l'Est-J) et de la larve de *D. melanogaster* (pour l'Est-7) (**Collet et al., 1990 ; Dumancic et al., 1997 ; Lopes et al., 2014 ; Mateus et al., 2011**). Compte-tenu de leur localisation et la nature de leur substrat, ces estérases seraient potentiellement impliquées dans la dégradation de xénobiotiques, phéromones et kairomones avec

lesquelles la larve entre en contact (**Fontan & Zerba, 1984 ; Vogt & Riddiford, 1986**). Par analogie il est envisageable que l'Est-6 soit aussi présente à la surface de la larve de *D. melanogaster* et qu'elle dégrade le cVA par contact lorsqu'elle s'alimente de substrat enrichi (**Sakaguchi & Suzuki, 2013 ; Yang, 2018**). Le cVOH en résultant serait ainsi détecté olfactivement à la place de la phéromone.

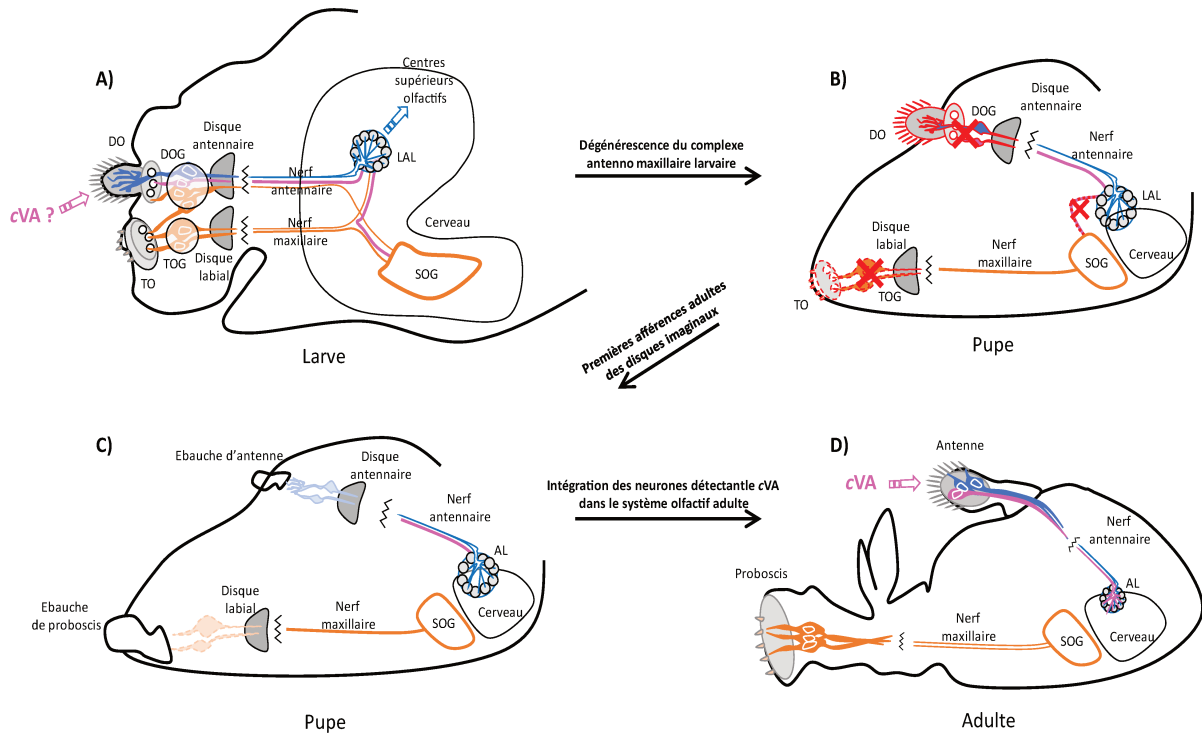
Dans ce cas de figure, le cVA serait très peu attractif à distance pour les larves (**Cobb & Dannet, 1994**) car il ne serait tout simplement pas détecté par ces dernières.

Pour la troisième hypothèse (iii), par analogie avec les acides (Z)-5-tétradécénoïques et (Z)-7-tétradécénoïques, les premières phéromones d'agrégation larvaires identifiées et détectées par les récepteurs gustatifs « *pickpocket* » ppk23 et ppk29 de la larve, il est concevable que la détection du cVA se fasse aussi au moyen de récepteurs gustatifs (**Mast et al., 2014**).

Dans ce cas de figure, il est nécessaire que des éléments impliqués dans la détection gustative du cVA au stade larvaire soient transmis au stade supérieur et intègrent le système olfactif adulte. Soutenant cette hypothèse, il est intéressant de noter que chez la larve les systèmes gustatifs et olfactifs sont moins « cloisonnés » que chez l'adulte. Dès le premier relai neuronal, les corps cellulaires des seuls ORN identifiés de ce stade et de certains GRN sont abrités dans la même structure : le ganglion de l'organe dorsal, qualifié d'organe « mixte » (**Komarov & Sprecher, 2022**). Les axones de ces groupes de neurones sont ensuite envoyés respectivement vers le lobe antennaire et la zone sous-œsophagienne en empruntant le même nerf : le nerf antennaire (**Komarov & Sprecher, 2022**). Enfin, une partie de ces afférences sensorielles convergent vers la zone sous-œsophagienne, celle-ci recevant à la fois les informations gustatives des organes terminaux, ventraux et pharyngaux, et olfactives de 6 uPN provenant des lobes antennaires (**Berck et al., 2016**).

Pendant la métamorphose, les ORN adultes s'organisent le long des ORN larvaires servant à la fois de patron d'organisation et de support jusqu'aux lobes antennaires (**Lienhard & Stocker, 1991**). De plus, certains des nerfs sensoriels larvaires dégénèrent à leur extrémité par la dégénérescence du complexe antenno-maxillaire, mais persistent grâce à l'arrivée des premières afférences antennaires adultes (**Lienhard & Stocker, 1991**). Il est envisageable qu'une partie des afférences olfactives adultes s'organisent le long de neurones gustatifs du nerf antennaire larvaire voire se connectent à des neurones initialement gustatifs, dont ceux détectant le cVA. Il est donc supposable que l'on retrouve dans le système olfactif

adulte une fraction de neurones hérités des neurones larvaires et assurant initialement la détection gustative de la phéromone (**Figure 24**).



**Figure 24** – Etapes hypothétiques d’intégration de neurones gustatifs larvaires dans le système nerveux central olfactif adulte chez *D. melanogaster*. (A) Le ganglion de l’organe dorsal larvaire (DOG) regroupe les corps cellulaires de neurones olfactifs (bleu) et gustatifs (orange), dont le neurone répondant au cVA (rose) ?? (Adapté de **Tissot et al., 1996**) (B) Lors de la métamorphose, la dégénérescence du complexe antenno-maxillaire conduit à la disparition de l’extrémité des neurones sensoriels l’innervant. (C) Le développement des premières fibres sensorielles adultes à partir des disques antennaires secourent les projections des fibres larvaires, dont celles des neurones répondant au cVA, (D) finalement intégrés au système olfactif central de l’adulte. DO : organe dorsal, TO : organe terminal, TOG : ganglion de l’organe terminal, AL : lobe antennaire larvaire, LAL : lobe antennaire larvaire, SOG : ganglion sous-œsophagien.

En considérant que le système nerveux central est le siège de transfert de mémoire entre stades larvaire et adulte pendant la métamorphose (**Ray, 1999**), cette dernière hypothèse semble cependant très peu plausible. En plus de l’intégration de neurones périphériques gustatifs larvaires dans le système olfactif adulte, elle impliquerait en effet que les structures centrales permettant la reconnaissance de la phéromone soient elles-aussi transférées du centre gustatif (le ganglion sous-oesophagien) aux centres olfactifs, ces derniers étant des candidats prometteurs dans le maintien d’une mémoire olfactive entre larve et adulte (**Pauls et al., 2010 ; Technau & Heisenberg, 1982**).

D'autres hypothèses, telles que la possibilité d'un couplage de récepteurs larvaires (formant des homo- ou hétérodimères) ou encore l'existence de modifications post-traductionnelles modifiant les récepteurs chez la larve, pourraient expliquer les différences de détection et comportement vis-à-vis du cVA observables entre larve et adulte.

### **Développement du SNC olfactif adulte**

Pendant la métamorphose, l'étude de coupes de cerveau et la visualisation du développement des principaux neuropiles olfactifs par lignées GAL4 ont permis de suivre les différentes étapes de formation du SN olfactif adulte (**Stocker et al., 1995 ; Tissot et al., 1996**).

Au niveau central, les lobes antennaires adultes se forment à partir des lobes antennaires larvaires qui serviraient de précurseurs. Lobes antennaires adultes et larvaires sont ainsi homologues, avec des schémas d'organisation communs (**Stocker et al., 1995**). Chronologiquement, (i) Les lobes antennaires larvaires sont complétés par des fibres adultes provenant des disques antennaires 6 à 9h après la formation de la pupa (**Tissot et al., 1996**). (ii) Les afférences provenant du troisième segment antennaire rejoignent les lobes antennaires ipsilatéraux et contralatéraux 24h et 30h respectivement après formation de la pupa. (iii) Les premières afférences antennaires arrivent dans les lobes antennaires 24h avant la formation des premiers glomérules adultes. Les branches terminales des axones des ORN entrant dans le lobe antennaire sont cependant plus dispersées que chez l'adulte et ne sont ainsi pas encore restreintes à un unique glomérule (**Stocker et al., 1995**). (iv) 48h après la pupaison, elles diminuent finalement progressivement pour n'innervent qu'un glomérule (**Tissot et al., 1996**).

Dans les MB (siège des mémoires olfactives à courts et longs termes), une première phase de prolifération embryonnaire permet aux neuroblastes de donner naissance à ~250 cellules de Kenyon  $\gamma$  (**Technau & Heisenberg, 1982**). Ils continuent ensuite de proliférer pendant le développement larvaire en donnant naissance à d'autres cellules de Kenyon  $\gamma$  pendant le premier stade larvaire et aux cellules de Kenyon  $\alpha'$  et  $\beta'$  pendant le troisième stade larvaire (**Lee et al., 1999**). La quasi-totalité de ces neurones ne survit cependant pas la transition entre le stade larvaire et le stade adulte. La métamorphose est en effet le siège d'une diminution drastique des projections des cellules de Kenyon qui, réduites à quelques centaines, sont complétées par de nouvelles projections imaginales et aboutissent à un total fixe supérieur à 2000 fibres chez l'adulte (**Technau & Heisenberg, 1982**).

Les neurones  $\gamma$ , se formant en grande partie pendant le développement embryonnaire (**Kunz et al., 2012**), est le seul type de cellules de Kenyon présent dans les MB à l'émergence de la larve hors de son œuf et qui survit à la fois à l'apoptose qui touche 30 à 40% des neurones larvaires juste après l'éclosion (**Larsen et al., 2009**) et à la métamorphose (**Lee et al., 1999 ; Technau & Heisenberg, 1982**). Ces caractéristiques en font d'excellents candidats comme siège de transfert d'apprentissages et de conditionnements olfactifs entre les premiers instants larvaires et adultes (**Pauls et al., 2010 ; Tissot & Stocker, 2000**).

La métamorphose est de plus la période de mise en place de la circuiterie neuronale sous-tendant le dimorphisme de comportement sexuel adulte (**Arthur et al., 1998 ; Belote & Baker, 1987**). L'organisation du système nerveux de la *Drosophile* mâle sous contrôle des gènes *fruitless*, *doublesex* et *transformer* commence en effet dans le cerveau de l'individu en stade pré-pupal (**Arthur et al., 1998 ; Baker & Ridge, 1980**), où le nombre de transcrits de *fru* est quasiment quadruplé jusqu'à la pupaison avant de décroître progressivement jusqu'à l'éclosion (**Lee et al., 2000**). Cette augmentation d'expression est localisée dans 20 clusters neuronaux du cerveau mâle, dont certains (les neurones *fru*-pSP2) se superposent aux neurones du calyx des MB (**Hall, 1979 ; Lee et al., 2000**). La colocalisation de neurone *fru*<sup>+</sup> avec les neurones des MB et l'expression maximale de *fruitless* pendant le stade pupal pourrait supposer qu'une partie de l'information stockée par les neurones des MB et résistants à la métamorphose serait relative au cVA, étayant davantage l'hypothèse que les MB seraient le lieu de stockage d'informations relatives à la phéromone entre larve et adulte.

## V - Limites des traitements pré-imaginaux

En plus du cVA, il est nécessaire de noter que l'environnement péri-natal des larves de *Drosophiles* admet un ensemble de différences entre les individus pondus à 1 et 5 jours après l'accouplement. Ces différences débutant dès la formation de l'œuf dans l'environnement intra-utérin des femelles pondeuses et pouvant entraîner des répercussions non contrôlées dans mes expériences (**Figure 25**) :

### Dégradation du cVA

**Mane et al., (1983)** et **Jallon et al., (1981)** ont détecté une perte, par la femelle gestante, de 70% du cVA initialement transmis par l'éjaculat mâle dès 6h après la copulation. 3 mécanismes l'expliquent : chronologiquement (i) l'éjection du bouchon copulatoire, (ii) la dégradation intra-utérine du cVA et enfin (iii) l'éjection du cVA pendant la ponte de la femelle.

- Le bouchon copulatoire (i) est une structure gélatineuse détectable dans le tractus femelle avant la transmission des spermatozoïdes par le mâle. Sa partie antérieure se forme 5 min après le début de l'accouplement et oblige les spermatozoïdes à se déplacer autour ou à travers afin d'atteindre le tractus femelle. Un des rôles présumés du bouchon serait de concentrer le sperme à l'entrée des organes de stockage femelles, limitant leur dispersion. Sa portion postérieure se forme à la fin de l'accouplement avant d'être entièrement éliminé par la femelle quelques heures après (**Lung & Wolfner, 2001**). L'étude de sa composition phéromonale par **Laturney & Billeter (2016)** a montré que le bouchon copulatoire pouvait renfermer jusqu'à 400 ng de cVA, contribuant largement aux résultats obtenus par **Mane et al., (1983)** et **Jallon et al., (1981)**.
- Le tractus mâle est le lieu de synthèse de l'Esterase-6 (ii) qui est transmise à la femelle pendant l'accouplement (**Sheehan et al., 1979**). L'Est-6 hydrolyse le cVA en *cis*-Vaccenol (cVOH) *in vitro* **Mane et al., (1983)** et il a ainsi été présumé qu'elle agissait dans le tractus femelle en participant à la dégradation de la phéromone.
- Le reste de cVA utérin est finalement déposé intact par la femelle sur son substrat de ponte (iii) (**Duménil et al., 2016**)

### Composition et transmission du fluide séminal

L'accouplement déclenche chez la femelle de nombreux changements comportementaux et physiologiques regroupés sous le terme de réponses post-copulatoires. Ces changements prennent notamment en compte une modification du



comportement alimentaire (augmentation de la prise alimentaire, modification des préférences alimentaires, diminution du transit intestinal permettant d'améliorer l'absorption de nutriments) (**Carvalho et al., 2006 ; Cognigni et al., 2011 ; Ribeiro & Dickson, 2010 ; Vargas et al., 2010**), une modification du comportement sexuel (augmentation du taux de ponte, diminution de la réceptivité sexuelle), une modification de la physionomie reproductrice (modification du tractus optimisant le stockage du sperme) et finalement une diminution de l'espérance de vie de la femelle (**Adams & Wolfner, 2007 ; Soller et al., 1997; Tram & Wolfner, 1999**).

Ces changements sont déclenchés par le transfert dans l'éjaculat du mâle, en plus du sperme et du cVA, d'un *cocktail* de protéines appelées protéines du fluide séminal. L'ensemble « sperme + protéines » forme un spermatophore. Les protéines du fluide séminal sont constituées des productions peptidiques, enzymatiques et lipidiques provenant de 4 sources du système reproducteur mâle : les cellules primaires et secondaires des glandes accessoires, le conduit éjaculatoire et le bulbe éjaculatoire (lieu de synthèse finale du cVA). **Manning (1962, 1967b)** différencia la réponse post-copulatoire de la femelle à court terme (1 à 2 jours) due au transfert de protéines séminales et les effets à long terme (> 5 jours) causés par le stockage du sperme (**Wolfner, 2002**).

Il a ensuite été détecté que l'accouplement, en plus de permettre le transfert extérieur d'HC par frottements des cuticules mâles et femelles (**Everaerts et al., 2010 ; Farine et al., 2012**), permettait aussi l'introduction d'HC dans le tractus femelle. La présence de 7T, 7P, 9T, 7,11HD et 7,11ND a en effet été mise en évidence à la fois dans le bouchon copulatoire par **Duménil et al., (2016)** et directement dans le tractus femelle par **Laturney & Billeter, (2016)**.

Les conduits et bulbes éjaculatoires permettent en plus la synthèse commune de drosomycine et d'andropine, protégeant le sperme du mâle d'infections bactériennes les premiers jours suivant l'accouplement (**Lung et al., 2001 ; Samakovlis et al., 1991 ; Wolfner, 2002 ; Ferrandon et al., 1998**). **Wolfner (2002)** induit l'hypothèse que les peptides antibactériens transmis du mâle à la femelle pourraient protéger - en plus du sperme - les premiers œufs pondus par cette dernière, induisant l'existence d'un gradient de « qualité » des descendants et un gradient d'exposition des larves selon leur ordre de ponte.

### **Protéines des glandes accessoires**

Les cellules primaires des glandes accessoires mâles permettent la synthèse d'environ 80 peptides, polypeptides et glycoprotéines regroupées en protéines des glandes accessoires (Acp) (**Chapman & Davies, 2004 ; Wolfner, 1997**). Certaines agissent comme pro-hormones en pénétrant la circulation hémolympatique de la femelle et en se fixant à des récepteurs de ses systèmes endocrines ou musculaires. D'autres font directement effet dans son tractus génital. L'Acp36DE par exemple ne migre pas mais s'accumule à la partie ventrale de la paroi de l'oviducte, devant l'ouverture des organes de stockage des spermatozoïdes avant que ceux-ci n'arrivent et facilite leur stockage (**Bertram et al., 1996 ; Bloch Qazi & Wolfner, 2003 ; Neubaum & Wolfner, 1999**).

Des 80 Acp, 3 peptides affectant la ponte et/ou la réceptivité femelle ont été identifiés chez *D. melanogaster* : l'Acp26Aa, la Dup99B (pour Ductus ejaculatorius peptide 99B) et l'Acp70A (ou sexe-peptide, SP) (**Chapman & Davies, 2004 ; Kubli, 2003**).

- L'Acp26Aa est transférée dans le tractus femelle 3 minutes après le début de l'accouplement. Une moitié pénètre l'hémolymphe de la femelle 10 minutes après le début de l'accouplement en traversant l'intima (barrière située en partie postérieure du vagin) et fait action sur le système octopaminergique (**Rubinstein & Wolfner, 2014 ; Lung & Wolfner, 1999 ; Monsma et al., 1990**). La moitié restante s'accumule à la base des ovaires, où elle fait action sur les muscles ovariens et stimule l'ovulation et l'oviposition des femelles récemment accouplées (**Chapman et al., 2001**). Ses effets sont limités aux premiers jours qui suivent l'accouplement (**Herndon & Wolfner, 1995**).
- La Dup99B, synthétisée dans le conduit éjaculatoire mâle, est un peptide de 31 acides-aminés partageant certaines similarités de séquences avec l'Acp70A (notamment la séquence C-terminale responsable de l'augmentation d'oviposition et diminution de la réceptivité femelle) (**Saudan et al., 2002**). Son rôle comme peptide sexuel n'est cependant pas clair : son injection dans la femelle augmente la ponte mais l'accouplement de femelles avec des mâles qui ne transmettent pas la Dup99B a peu d'impact sur leur fréquence de ponte. La Dup99B est en plus incapable de stimuler la production d'Hormone Juvénile (JH) (**Fan et al., 2000**)
- L'Acp70A, sa présence dans l'éjaculat mâle est responsable à court-terme de la perte de réceptivité femelle et à long terme de l'augmentation du taux de ponte de

la femelle. Sa ligation à la tête des spermatozoïdes par son extrémité N-terminale suggère que le sperme stocké agirait comme un substrat permettant sa libération lente, et expliquerait le maintien des effets de l'Acp au-delà de 5 jours (**Saudan et al., 2002**). Il peut ensuite être transporté par l'hémolymphe jusqu'à ses récepteurs dédiés répartis dans le système nerveux central et périphérique (**Ottiger et al., 2000**) et aux Corpora Allata de la femelle (**Moshitzky et al., 1996 ; Soller et al., 1997**). Ces derniers étant le lieu de synthèse de la JH, l'Acp70A stimulerait la ponte en déclenchant la libération de JH, à son tour stimulant la progression des ovocytes dans les ovaires (**Bontonou et al., 2015**).

L'activité du sperme et celle des protéines des glandes accessoires sont ainsi complémentaires et interdépendantes : la fertilité du sperme nécessite les protéines des glandes accessoires, qui à leur tour dépendent de la présence du sperme pour maintenir leurs effets à long terme.

### Qualité du sperme

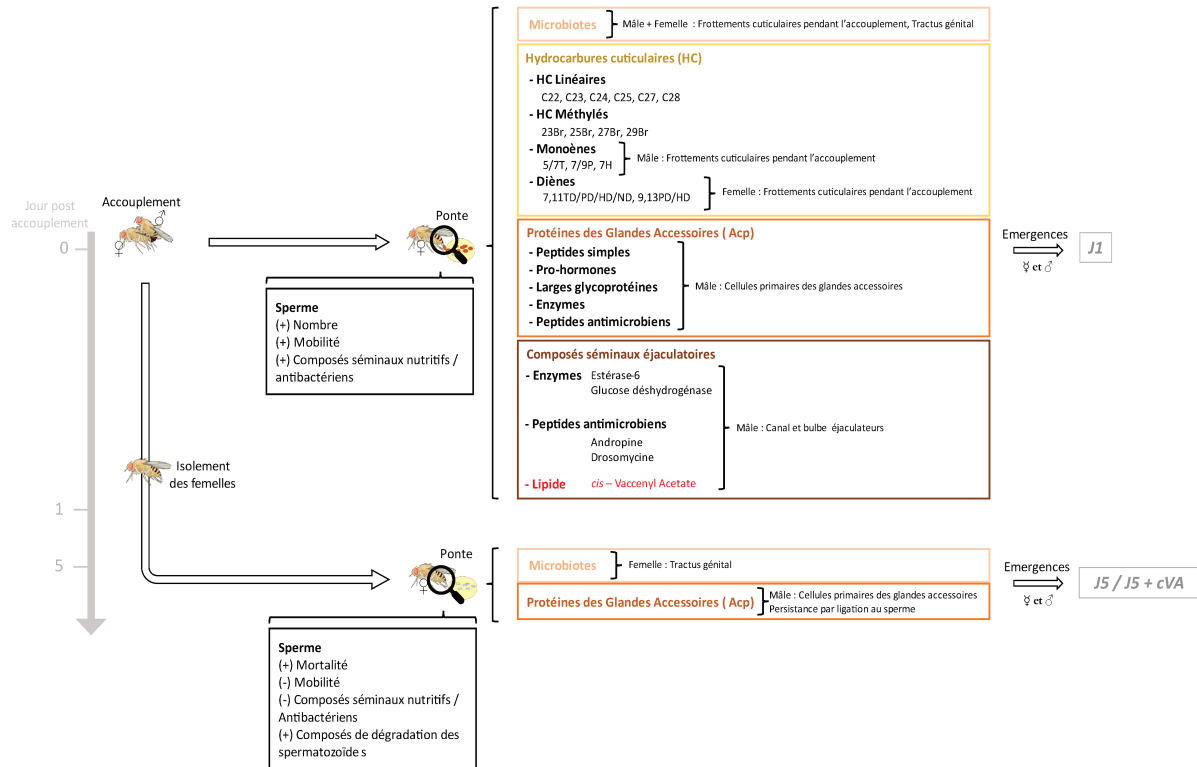
En cas d'accouplements multiples d'une femelle, les mâles produisant les spermatozoïdes les plus grands (moins susceptibles d'être remplacés par les spermatozoïdes d'un autre mâle et davantage stockés car occupant mieux l'espace dans le réceptacle séminal), en plus grand nombre, les plus mobiles ou les plus résistants possèdent un avantage sur les autres mâles (**Birkhead et al., 1999; Gage et al., 2004; Letsinger & Gromko, 1985; Parker, 1993; Pattarini et al., 2006; Snook & Karr, 1998**).

Dans le cas d'un accouplement unique (mon étude), il est possible d'envisager l'existence d'une compétition « intra-éjaculat » (**Sutter & Immler, 2020**). Celle-ci favoriserait les spermatozoïdes les plus grands ou vigoureux, qui sont de plus accompagnés des Acp et composés antibactériens transférés par le mâle les premiers jours qui suivent l'accouplement. Les spermatozoïdes stockés (10 à 20% des spermatozoïdes totaux transférés - **Fowler, 1973**) et utilisés les jours suivant par la femelle subiraient, en plus de la compétition, leur propre senescence (provoquant l'accumulation de stress oxydatif, une perte de leur mobilité et à terme leur mort) (**Bréque et al., 2003**). La fertilisation par des spermatozoïdes âgés peut de plus avoir des conséquences dramatiques sur la survie du zygote (**Reinhardt, 2007**).

Bien que 5 jours soit un temps relativement court dans la vie d'une Drosophile, **Radhakrishnan & Fedorka (2011)** ont observé un déclin du tiers des spermatozoïdes stockés en seulement 120h en étudiant le devenir du sperme dans le tractus femelle.

## Discussion

En outre, il est possible que la mort des spermatozoïdes stockés émette des composés intra-utérins déposés sur les œufs plus âgés et modifient l'expérience des larves à leur éclosion. Il peut donc être envisagé un impact, même minime, de la qualité du sperme sur la vigueur et *in fine* sur les performances comportementales et/ou électrophysiologiques des individus provenant des traitements pré-imaginaux testés.



**Figure 25** – Différences principales de l'environnement intra-utérin de femelles accouplées le jour même de la ponte ou 5 jours avant.





**CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES**



## Conclusion

---

Ce travail, mené sur 3 ans, a permis d'apporter de nouveaux éléments de réflexion sur l'importance de l'environnement péri-natal d'un individu dans l'établissement d'interactions adaptées avec ses conspécifiques une fois atteint l'âge adulte.

En manipulant l'expérience phéromonale pré-imaginale de *Drosophila melanogaster*, insecte holométabole de référence, j'ai pu étudier l'attraction à distance et la réponse électrophysiologique antennaire d'individus exposés naturellement (J1), non-exposés (J5) ou exposés synthétiquement (J5+cVA) au cVA.

Les expériences réalisées en tunnel de vol ont mis en évidence des effets spécifiques au sexe de l'imprégnation au cVA dans l'attraction adulte à la phéromone. L'exposition synthétique à la phéromone seule ne suffit cependant pas à rétablir pleinement l'attraction observée dans une exposition naturelle. Cette attraction apparaît de plus dépendante de la nature des hydrocarbures cuticulaires présents sur la nourriture et du choix de nourritures proposées.

Les enregistrements électroantennographiques réalisés après présentation de cVA ont mis en évidence des différences de réponses périphériques selon la modalité d'exposition pré-imaginale à la phéromone, mais pas selon le sexe. Il semble donc que les différences comportementales observables en tunnel de vol s'expliquent par le dimorphisme central de circuiterie neuronale du cVA plutôt que par une détection périphérique différente de la phéromone. Finalement, l'absence de différence de réponses entre les individus non-exposés et exposés synthétiquement soutient davantage la nécessité de contacts avec d'autres composés en plus du cVA pendant la période larvaire afin de permettre l'imprégnation totale à la phéromone.

Pour donner suite aux expériences menées pendant cette thèse, plusieurs projets envisageables permettraient de palier aux principaux biais de l'étude et d'améliorer notre compréhension du phénomène d'empreinte :

- Il est nécessaire de compléter le protocole des traitements pré-imaginaires avec des conditions visant à (i) limiter l'imprégnation au cVA d'individus J1 par lavage ou déchorionnage des œufs et (ii) restaurer l'imprégnation d'individus J5, par un autre procédé que l'enrichissement manuel des nourritures. Il pourrait ainsi être intéressant (i) de tester le comportement et la réponse EAG d'individus J1 issus d'œufs déchorionnés (lavés à l'eau de Javel) et ainsi débarrassés des



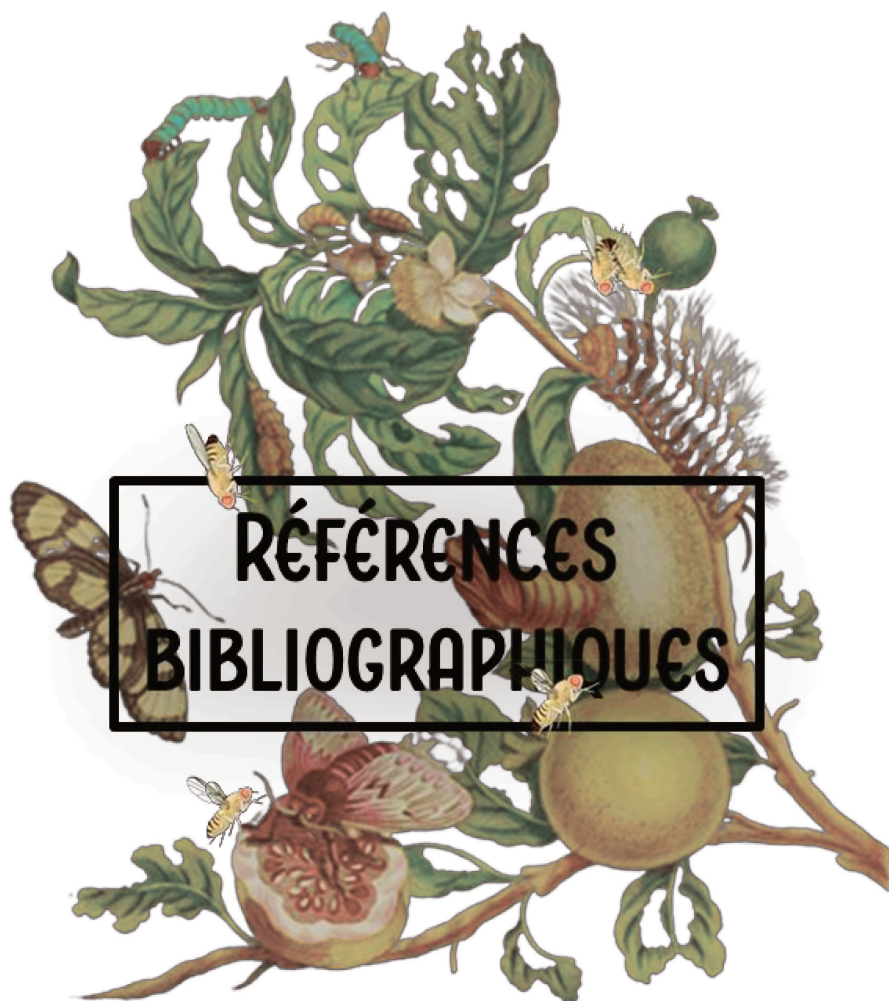
microorganismes, hydrocarbures, peptides sexuels, produits de dégradation des spermatozoïdes et phéromones transmis par les parents aux premières pontes (**Narasimha et al., 2019 ; Rand et al., 2010**). Inversement, (ii) il serait nécessaire de tenter de rétablir naturellement l'imprégnation au cVA en testant des individus J5 pondus dans une nourriture manipulée par des conspécifiques des deux sexes, aux côtés d'œufs pondus à J1, et dans laquelle la micro-distribution du cVA, et de tous les autres composés normalement présents péri-natalement, se rapprocherait d'un schéma naturel (**Everaerts et al., 2018**). En utilisant une deuxième lignée portant l'intron *white*, les descendants issus de ces œufs J1 seraient facilement discriminables selon la couleur de leurs yeux et écartés des individus J5 après l'émergence (**Lee & Carthew, 2003**).

- Afin de déterminer quel(s) composé(s) transmis avec le cVA pendant les premières pontes rendent l'imprégnation à la phéromone efficace (**Everaerts et al., 2018**), il serait intéressant de tester des descendants J1 issus (i) de lignées *Drosophila melanogaster* *œnocytes-less* et (ii) de mâles DTA-D. La lignée *œnocytes-less* (i) est défectueuse dans sa production d'HC par expression d'un gène pro-apoptotique dans ses *œnocytes*, mais les mâles de cette lignée produisent tout de même des quantités standards de cVA (**Billeter et al., 2009**). Leur accouplement avec des femelles elles aussi *œnocytes-less* permettraient d'étudier des descendants recevant du cVA et des composés du fluide séminal mais pas d'HC parentaux. Les mâles DTA-D (ii) expriment une toxine anti-traductrice dans leurs cellules primaires des glandes accessoires et produisent donc du sperme fertile mais dépourvu d'Acp (**Kalb et al., 1993**).
- Les *Drosophiles* utilisées en vol étaient toutes à jeun et vierges afin de stimuler leur envol (**Becher et al., 2010**). Sachant que le cVA déclenche l'agrégation des mouches en fonction de leur état physiologique (**Lebreton et al., 2014, 2015**), il est probable que des mouches imprégnées et nourries ou gravides ne fassent pas les mêmes choix que ceux observés dans mes expériences. Il serait intéressant de tester cette hypothèse afin d'avoir une vision plus complète des limites de la phéromone dans le comportement d'attraction des *Drosophiles*.
- En plus des gènes *fruitless* et *doublesex*, la différenciation sexuelle de *D. melanogaster* est régie par un ensemble de loci régulateurs agissant en cascade et déterminant le devenir des cellules somatiques des individus (**McKeown et al.,**

**1987**). Ces loci comprennent notamment le gène *transformer* dont l'expression ectopique dans les œnocytes de mâles génétiques féminise leur profil cuticulaire. La présence en excès des transcrits de ce gène ou leur absence totale dans les œnocytes femelles, masculinise leur HC (**Savarit & Ferveur, 2002a**). Il serait ainsi intéressant de tester l'attraction à distance et la réponse antennaire de mâles dont les antennes et/ou lobes antennaires auraient été féminisés par expression ectopique de *transformer* dans ces structures.

- La détection périphérique du cVA se faisant au moyen des deux récepteurs Or65a et 67d (**Auer & Benton, 2016**), il faudrait déterminer le(s)quel(s) est(sont) impliqué(s) dans les différences de réponses électroantennographiques observables entre les traitements d'exposition par enregistrements mono-sensillaires (**van der Goes van Naters & Carlson, 2007**).
- Après l'étude du comportement et de la réactivité antennaire, il serait intéressant de visualiser la plasticité du système nerveux central adulte en réponse à l'imprégnation, soit par expression d'une protéine fluorescente permettant de mesurer le volume des gloméruli DA1 et DL3 répondant au cVA (**Devaud et al., 2001, 2003**), soit de manière dynamique par expression d'un rapporteur de l'activité calcique de ces gloméruli et permettant de visualiser leur schéma d'activation en temps réel lors de la détection de la phéromone (**Mercier et al., 2018**).
- Les corps pédonculés apparaissant comme « candidat prometteur » dans le transfert de l'imprégnation du stade larvaire au stade adulte, il serait nécessaire de tester le comportement et la réponse antennaire de mouches dont les MB auraient été chimiquement et/ou génétiquement ablatés, totalement puis lobe par lobe, à différents stades de développement (**de Belle & Heisenberg, 1994 ; Heisenberg et al., 1985 ; Pascual & Prétat, 2001**).





**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abuin, L.,** Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., Abuin, L., & Benton, R. (2011). Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. *Neuron*, 69, 44–60.
- Adams, E. M.,** & Wolfner, M. F. (2007). Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the *Drosophila melanogaster* female reproductive tract during sperm storage. *Journal of Insect Physiology*, 53(4), 319–331.
- Akalal, D. G.,** Yu, D., & Davis, R. L. (2010). A Late-Phase , Long-Term Memory Trace Forms in the y Neurons of *Drosophila* Mushroom Bodies after Olfactory Classical Conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 30(Dcember), 16699–16708.
- Akalal, D. G.,** Yu, D., & Davis, R. L. (2011). The Long-Term Memory Trace Formed in the *Drosophila* Mushroom Body Neurons Is Abolished in Long-Term Memory Mutants. *The Journal of Neuroscience*, 31(15), 5643–5647.
- Akino, T.** (2006). Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae): Description of new very long chained hydrocarbon components. *Applied Entomology and Zoology*, 41(4), 667–677.
- Alberts, J. R.,** & May, B. (1984). Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 17(2), 161–181.
- Altner, H.,** & Prillinger, L. (1980). Ultrastructure of Invertebrate Chemo-, Thermo-, and Hygroreceptors and Its Functional Significance. *International Review of Cytology*, 67, 69–139.
- Amárita, F.,** Fernández-Esplá, D., Requena, T., & Pelaez, C. (2001). Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1), 189–195.
- Amrein, H.** (2004). Pheromone perception and behavior in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(4), 435–442.
- Anagnostou, C.,** LeGrand, E. A., & Rohlf, M. (2010). Friendly food for fitter flies? - Influence of dietary microbial species on food choice and parasitoid resistance in *Drosophila*. *Oikos*, 119(3), 533–541.
- Anderson, P.,** Sadek, M. M., Larsson, M., Hansson, B. S., & Thöming, G. (2013). Larval host plant experience modulates both mate finding and oviposition choice in a moth. *Animal Behaviour*, 85(6), 1169–1175.
- Anholt, R. R. H.,** & Williams, T. I. (2009). The soluble proteome of the *Drosophila* antenna. *Chemical Senses*, 35(1), 21–30.
- Antony, C.,** & Jallon, J. M. (1982). The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 28(10), 873–880.
- Arienti, M.,** Antony, C., Wicker-Thomas, C., Delbecq, J. P., & Jallon, J. M. (2010). Ontogeny of *Drosophila melanogaster* female sex-appeal and cuticular hydrocarbons. *Integrative Zoology*, 5(3), 272–282.
- Arthur, B.,** Jallon, J. M., Caflisch, B., Choffat, Y., & Nöthiger, R. (1998). Sexual behaviour in *Drosophila* is irreversibly programmed during a critical period. *Current Biology*, 8(21), 1187–1190.

- Aspi, J., & Hoffmann, A. A.** (1998). Female encounter rates and fighting costs of males are associated with lek size in *Drosophila mycetophaga*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42(3), 163–169.
- Atkinson, W., & Shorrocks, B.** (1977). Breeding site specificity in the domestic species of *Drosophila*. *Oecologia*, 29(3), 223–232.
- Auer, T. O., & Benton, R.** (2016). Sexual circuitry in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 38, 18–26.
- Ayrinhac, A., Debat, V., Gibert, P., Kister, A. G., Legout, H., Moreteau, B., Vergilino, R., & David, J. R.** (2004). Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: Phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional Ecology*, 18(5), 700–706.
- Bailly, T. P. M., Kohlmeier, P., Etienne, R. S., Wertheim, B., & Billeter, J.-C.** (2021). Social modulation of oogenesis and egg-laying in *Drosophila melanogaster*. *BioRxiv*, 40.
- Baker, B., & Ridge, K.** (1980). Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 94(2), 383–423.
- Baker, R.** (1983). Insect territoriality. *Annual Review of Entomology*, 28, 65–89.
- Baker, T., Willis, M., Haynes, K., & Phelan, P.** (1985). A pulsed cloud of sex pheromone elicits upwind flight in male moths. *Physiological Entomology*, 10(3), 257–265.
- Bakula, M.** (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(3), 365–374.
- Barron, A. B., & Corbet, S. A.** (1999). Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal Behaviour*, 58, 621–628.
- Barrows, W. M.** (1907). The reactions of the Pomace fly, *Drosophila ampelophila* loew, to odorous substances. *Journal of Experimental Zoology*, 4(4), 515–537.
- Bartelt, Robert J., Schaner, A. M., & Jackson, L. L.** (1985). cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, 11(12), 1747–1756.
- Bartelt, Robert J., Schaner, A. M., & Jackson, L. L.** (1986). Aggregation pheromones in five taxa of the *Drosophila virilis* species group. *Physiological Entomology*, 11(4), 367–376.
- Bartelt, Robert J., Weaver, D. K., & Arbogast, R. T.** (1995). Aggregation pheromone of *Carpophilus dimidiatus* (F.) (Coleoptera: Nitidulidae) and responses to *Carpophilus* pheromones in South Carolina. *Journal of Chemical Ecology*, 21(11), 1763–1779.
- Bashir, T., Birkinshaw, L. A., Hall, D. R., & Hodges, R. J.** (2001). Host odours enhance the responses of adult *Rhyzopertha dominica* to male-produced aggregation pheromone. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101(3), 273–280.
- Bateson, P. P.** (1966). The characteristics and context of imprinting. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 41(2), 177–217.

- Bateson**, P. P., Rose, S. P. R., & Horn, G. (1973). Imprinting: Lasting Effects on Uracil Incorporation into Chick Brain. *Science*, *181*, 576–578.
- Becher**, P. G., Bengtsson, M., Hansson, B. S., & Witzgall, P. (2010). Flying the fly: Long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(6), 599–607.
- Becher**, P. G., Flick, G., Rozpedowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M. C., Hansson, B. S., Piškur, J., Witzgall, P., & Bengtsson, M. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, *26*(4), 822–828.
- Beck**, C. D. O., Schroeder, B., & Davis, R. L. (2000). Learning performance of normal and mutant *Drosophila* after repeated conditioning trials with discrete stimuli. *Journal of Neuroscience*, *20*(8), 2944–2953.
- Beck**, H., Hansen, A., & Lauritsen, F. (2002). Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(1–2), 94–101.
- Belote**, J., & Baker, B. (1987). Sexual behavior: its genetic control during development and adulthood in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(22), 8026–8030.
- Benton**, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant Ionotropic Glutamate Receptors as Chemosensory Receptors in *Drosophila*. *Cell*, *136*(1), 149–162.
- Benton**, R., Vannice, K. S., & Vosshall, L. B. (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, *450*(7167), 289–293.
- Bentzur**, A., Shmueli, A., Omesi, L., Ryvkin, J., Knapp, J. M., Parnas, M., Davis, F. P., & Shohat-Ophir, G. (2018). Odorant binding protein 69a connects social interaction to modulation of social responsiveness in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *14*(4), 1–23.
- Beny**, Y., & Kimchi, T. (2014). Innate and learned aspects of pheromone-mediated social behaviours. *Animal Behaviour*, *97*, 301–311.
- Benzer**, S. (1967). Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by countercurrent distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *58*(3), 1112–1119.
- Berardi**, N., Pizzorusso, T., Maffei, L., Moruzzi, V. G., & Psicologia, D. (2004). Extracellular Matrix and Visual Cortical Plasticity : Freeing the Synapse. *Neuron*, *44*(December), 905–908.
- Berck**, M. E., Khandelwal, A., Claus, L., Hernandez-Nunez, L., Si, G., Tabone, C. J., Li, F., Truman, J. W., Fetter, R. D., Louis, M., Samuel, A. D. T., & Cardona, A. (2016). The wiring diagram of a glomerular olfactory system. *ELife*, *5*, 1–21.
- Bertram**, M. J., Neubaum, D. M., & Wolfner, M. F. (1996). Localization of the *Drosophila* male accessory gland protein Acp36DE in the mated female suggests a role in sperm storage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *26*(8–9), 971–980.



- Bhagavan**, S., & Smith, B. (1997). Olfactory Conditioning in the Honey Bee , *Apis mellifera* : Effects of Odor Intensity. *Physiology and Behavior*, *61*(1), 107–117.
- Bilen**, J., Atallah, J., Azanchi, R., Levine, J. D., & Riddiford, L. M. (2013). Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(45), 18321–18326.
- Billeter**, J. C., Atallah, J., Krupp, J., Millar, J., & Levine, J. (2009). Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, *461*, 987–991.
- Billeter**, J. C., Rideout, E. J., Dornan, A. J., & Goodwin, S. F. (2006). Control of Male Sexual Behavior in *Drosophila* by the Sex Determination Pathway. *Current Biology*, *16*(September), 766–776.
- Billeter**, J. C., & Wolfner, M. F. (2018). Chemical Cues that Guide Female Reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, *44*(9), 750–769.
- Birkhead**, T. R., Mart, J. G., Burke, T., & Froman, D. P. (1999). Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc. R. Soc. Lond. B*, *266*(June), 1759–1764.
- Bloch Qazi**, M. C., & Wolfner, M. F. (2003). An early role for the *Drosophila melanogaster* male seminal protein Acp36DE in female sperm storage. *Journal of Experimental Biology*, *206*(19), 3521–3528.
- Blomquist**, G. J., & Bagnères, A.-G. (2010). *Insect hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*.
- Blows**, M. (2002). Interaction between natural and sexual selection during the evolution of mate recognition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *269*(1496), 1113–1118.
- Bolhuis**, Johan J., Johnson, M. H., & Horn, G. (1985). Effects of Early Experience on the Development of Filial Preferences in the Domestic Chick. *Developmental Psychobiology*, *18*, 199–308.
- Bolhuis**, Johan J. (1991). Mechanisms of avian imprinting : a Review. *Biol. Rev*, *66*, 303–345.
- Bolhuis**, Johan J., Brown, M. W., & Johnson, M. H. (2015). Brain, memory and development: The imprint of Gabriel Horn. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *50*, 1–3.
- Bonnarme**, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H. E., & Yvon, M. (2004). Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, *236*(1), 85–90.
- Bontonou**, G., Shaik, H. A., Denis, B., & Wicker-Thomas, C. (2015). Acp70A regulates *Drosophila* pheromones through juvenile hormone induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *56*, 36–49.
- Borrero-Echeverry**, F., Solum, M., Trona, F., Becher, P. G., Wallin, E. A., Bengtsson, M., Witzgall, P., & Lebreton, S. (2022). The female sex pheromone (Z)-4-undecenal mediates flight attraction and courtship in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, *137*(October 2021), 104355.

- Bréque**, C., Surai, P., & Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 66(3), 314–323.
- Brieger**, G., & Butterworth, F. M. (1970). *Drosophila melanogaster*: Identity of Male Lipid in Reproductive System. *Science*, 167(3922), 1262.
- Brown**, R. E. (1982). Preferences of pre- and post-weanling long-evans rats for nest odors. *Physiology and Behavior*, 29(5), 865–874.
- Bruce**, A., Verrall, S., Hackett, C. A., & Wheatley, R. E. (2004). Identification of volatile organic compounds (VOCS) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi. *Holzforchung*, 58(2), 193–198.
- Budick**, S. A., Reiser, M. B., & Dickinson, M. H. (2007). The role of visual and mechanosensory cues in structuring forward flight in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 210(23), 4092–4103.
- Bursell**, E. (1984). Observations on the orientation of tsetse flies (*Glossina pallidipes*) to wind-borne odours. *Physiological Entomology*, 9(2), 133–137.
- Butterworth**, F. M. (1969). Lipids of *Drosophila*: A newly detected lipid in the male. *Science*, 163, 1356–1357.
- Cachero**, S., Ostrovsky, A. D., Yu, J. Y., Dickson, B. J., & Jefferis, G. S. X. E. (2010). Sexual dimorphism in the fly brain. *Current Biology*, 20(18), 1589–1601.
- Calderón-Fernández**, G., Girotti, J., & Juárez, P. (2011). Cuticular hydrocarbons of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae): Intraspecific variation and chemotaxonomy. *Journal of Medical Entomology*, 48(2), 262–271.
- Candland**, D. K. (1969). Discriminability of facial regions used by the domestic chicken in maintaining the social dominance order. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 69(2), 281–285.
- Capy**, P., & Gibert, P. (2004). *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*: So similar yet so different. *Genetica*, 120(1–3), 5–15.
- Carlson**, E. A. (2013). How fruit flies came to launch the chromosome theory of heredity. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 753(1), 1–6.
- Carracedo**, M. C., Suarez, A., Asenjo, A., & Casares, P. (1998). Genetics of hybridization between *Drosophila simulans* females and *D. melanogaster* males. *Heredity*, 80(1), 17–24.
- Carvalho**, G. B., Kapahi, P., Anderson, D. J., & Benzer, S. (2006). Allocrine Modulation of Feeding Behavior by the Sex Peptide of *Drosophila*. *Current Biology*, 16(7), 692–696.
- Cassau**, S., & Krieger, J. (2021). The role of SNMPs in insect olfaction. *Cell and Tissue Research*, 383(1), 21–33.
- Cazalé-Debat**, L., Houot, B., Farine, J. P., Everaerts, C., & Ferveur, J. F. (2019). Flying *Drosophila* show sex-specific attraction to fly-labelled food. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Cha**, D. H., Adams, T., Rogg, H., & Landolt, P. J. (2012). Identification and Field Evaluation of Fermentation Volatiles from Wine and Vinegar that Mediate Attraction of Spotted Wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(11), 1419–1431.

- Chapman**, R. F. (1998). *The Insects Structure and Function*.
- Chapman**, T., Herndon, L. A., Heifetz, Y., Partridge, L., & Wolfner, M. F. (2001). The Acp26Aa seminal fluid protein is a modulator of early egg hatchability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1477), 1647–1654.
- Chapman**, Tracey, & Davies, S. J. (2004). Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. *Peptides*, 25(9), 1477–1490.
- Chen**, C., Denome, S., & Davis, R. L. (1986). Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce* ' gene , the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(December), 9313–9317.
- Chen**, D., Sitaraman, D., Chen, N., Jin, X., Han, C., Chen, J., Sun, M., Baker, B. S., Nitabach, M. N., & Pan, Y. (2017). Genetic and neuronal mechanisms governing the sex-specific interaction between sleep and sexual behaviors in *Drosophila*. *Nature Communications*, 8(1), 1–13.
- Chen**, P. S., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M., & Böhlen, P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, 54(3), 291–298.
- Cheng**, Y., Endo, K., Wu, K., Rodan, A. R., Heberlein, U., & Davis, R. L. (2001). *Drosophila* fasciclinII Is Required for the Formation of Odor Memories and for Normal Sensitivity to Alcohol. *Cell*, 8674(July), 757–768.
- Chertemps**, T., Duportets, L., Labeur, C., & Wicker-Thomas, C. (2005). A new elongase selectively expressed in *Drosophila* male reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(4), 1066–1072.
- Chertemps**, T., François, A., Durand, N., Rosell, G., Dekker, T., Lucas, P., & Maïbèche-Coisne, M. (2012). A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC Biology*, 10(1), 12.
- Chess**, K. F., Ringo, J. M., & Dowse, H. B. (1990). Oviposition by Two Species of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Behavioral Responses to Resource Distribution and Competition. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(4), 717–724.
- Claudianos**, C., Lim, J., Young, M., Yan, S., Cristino, A. S., Newcomb, R. D., Gunasekaran, N., & Reinhard, J. (2014). Odor memories regulate olfactory receptor expression in the sensory periphery. *European Journal of Neuroscience*, 1–13.
- Clowney**, E. J., Iguchi, S., Bussell, J. J., Scheer, E., & Ruta, V. (2015a). Multimodal Chemosensory Circuits Controlling Male Courtship in *Drosophila*. *Neuron*, 87, 1036–1049.
- Clowney**, E. J., Iguchi, S., Bussell, J. J., Scheer, E., & Ruta, V. (2015b). Multimodal Chemosensory Circuits Controlling Male Courtship in *Drosophila*. *Neuron*, 87(5), 1036–1049.
- Clyne**, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (1999). A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: Candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2), 327–338.

- Cobb**, M., Bruneau, S., & Jallon, J. (1992). Genetic and developmental factors in the olfactory response of *Drosophila melanogaster* larvae to alcohols. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 248, 103–109.
- Cobb**, M., & Dannet, F. (1994). Multiple genetic control of acetate-induced olfactory responses in *Drosophila melanogaster* larvae. *Heredity*, 73(4), 444–455.
- Cognigni**, P., Bailey, A. P., & Miguel-Aliaga, I. (2011). Enteric neurons and systemic signals couple nutritional and reproductive status with intestinal homeostasis. *Cell Metabolism*, 13(1), 92–104.
- Colazza**, S., Aquila, G., De Pasquale, C., Peri, E., & Millar, J. G. (2007). The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses n-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 33(7), 1405–1420.
- Collet**, C., Nielsen, K. M., Russel, R. J., Karl, M., Oakeshott, J. G., & Richmond, R. C. (1990). Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 7(1), 9–28.
- Corbet**, S. A. (1985). Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology*, 10(2), 143–153.
- Corby-Harris**, V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E., & Promislow, D. E. L. (2007). Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3470–3479.
- Cortot**, J., Farine, J. P., Cobb, M., Everaerts, C., & Ferveur, J. F. (2022). Factors affecting the biosynthesis and emission of a *Drosophila* pheromone. *Journal of Experimental Biology*, 225(13), 21.
- Coureaud**, G., Charra, R., Datiche, F., Sinding, C., Thomas-Danguin, T., Languille, S., Hars, B., & Schaal, B. (2010). A pheromone to behave, a pheromone to learn: The rabbit mammary pheromone. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 196(10), 779–790.
- Coureaud**, G., Moncomble, A. S., Montigny, D., Dewas, M., Perrier, G., & Schaal, B. (2006). A Pheromone That Rapidly Promotes Learning in the Newborn. *Current Biology*, 16(19), 1956–1961.
- Couto**, A., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2005). Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Current Biology*, 15(17), 1535–1547.
- Coyne**, J. A., Boussy, I. A., Prout, T., Bryant, S. H., Jones, J. S., & Moore, J. A. (1982). Long-distance migration of *Drosophila*. *American Naturalist*, 119(October), 589–595.
- Croset**, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T. J., & Benton, R. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genetics*, 6(8), 1–20.
- Dallerac**, R., Labeur, C., Jallon, J. M., Knipple, D. C., Roelofs, W. L., & Wicker-Thomas, C. (2000). A  $\delta 9$  desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9449–9454.

- Dani**, F. R., Jones, G. R., Destri, S., Spencer, S. H., & Turillazzi, S. (2001). Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Animal Behaviour*, *62*(1), 165–171.
- Darmaillacq**, A. S., Chichery, R., & Dickel, L. (2006). Food imprinting, new evidence from the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Biology Letters*, *2*(3), 345–347.
- Das**, S., Sadanandappa, M. K., Dervan, A., Larkin, A., & Anthony, J. (2011). Plasticity of local GABAergic interneurons drives olfactory habituation. *PNAS*, *108*(36), 2–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106411108>
- Das**, S., Trona, F., Khallaf, M. A., Schuh, E., Knaden, M., Hansson, B. S., & Sachse, S. (2017). Electrical synapses mediate synergism between pheromone and food odors in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, *10*.
- Datta**, S. R., Vasconcelos, M. L., Ruta, V., Luo, S., Wong, A., Demir, E., Flores, J., Balonze, K., Dickson, B. J., & Axel, R. (2008). The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit. *Nature*, *452*(7186), 473–477.
- David**, C. T., Kennedy, J. S., & Ludlow, A. R. (1983). Finding of a sex pheromone source by gypsy moths released in the field. *Nature*, *303*(5920), 804–806.
- David**, J., Lemeunier, F., Tsacas, L., & Yassin, A. (2007). The historical discovery of the nine species in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Genetics*, *177*(4), 1969–1973.
- David**, J. R., & Bocquet, C. (1975). Similarities and differences in latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species. *Nature*, *257*(October 16), 588–590.
- David**, J. R., & Capy, P. (1988). Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends in Genetics*, *4*(4), 106–111.
- Davis**, R. L. (1993). Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron*, *11*(1), 1–14.
- Davis**, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: From molecular to systems neuroscience. *Annual Review of Neuroscience*, *28*, 275–302.
- Davis**, R. L. (2011). Traces of *Drosophila* Memory. *Neuron*, *70*(1), 8–19.
- de Belle**, J. S., & Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science*, *263*(February), 692–695.
- de Bruyne**, M., Foster, K., & Carlson, J. R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, *30*(2), 537–552.
- de Jong**, R., & Pham-Delègue, M.-H. (1991). Electroantennogram responses related to olfactory conditioning in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, *37*(4), 319–324.
- de Renobales**, M., & Blomquist, G. J. (1983). A developmental study of the composition and biosynthesis of the cuticular hydrocarbons of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry*, *13*(5), 493–502.
- de Vos Petersen**, C., Beck, H. C., & Lauritsen, F. R. (2004). On-Line Monitoring of Important Organoleptic Methyl-Branched Aldehydes during Batch Fermentation of Starter Culture *Staphylococcus xylosum* Reveal New Insight into Their Production in a Model Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *85*(3), 298–305.

- del Giudice**, L., Massardo, D. R., Pontieri, P., Berteà, C. M., Mombello, D., Carata, E., Tredici, S. M., Talà, A., Mucciarelli, M., Groudeva, V. I., De Stefano, M., Vigliotta, G., Maffei, M. E., & Alifano, P. (2008). The microbial community of Vetiver root and its involvement into essential oil biogenesis. *Environmental Microbiology*, *10*(10), 2824–2841.
- Devaud**, J., Acebes, A., & Ferru, A. (2001). Odor Exposure Causes Central Adaptation and Morphological Changes in Selected Olfactory Glomeruli in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, *21*(16), 6274–6282.
- Devaud**, J., Acebes, A., Ramaswami, M., & Ferru, A. (2003). Structural and Functional Changes in the Olfactory Pathway of Adult. *Inc. J. Neurobiol*, *56*, 13–23.
- Dicke**, M., & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Functional Ecology*, *2*(2), 131.
- Dicke**, M., van Lenteren, J. C., Boskamp, G. J. F., & van Voorst, R. (1985). Intensification and prolongation of host searching in *Leptopilina heterotoma* (Thomson) (Hymenoptera: Eucoilidae) through a kairomone produced by *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, *11*(1), 125–136.
- Dicke**, M., Vet, L. E. M., Wiskerke, J. S. C., & Stapel, O. (1994). Parasitoid of *Drosophila* larvae solves foraging problem through infochemical detour: conditions affecting employment of this strategy. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, *16*, 227–232.
- Dickinson**, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., & Hewlins, M. J. E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(15), 10937–10942.
- Dickinson**, J. R., Harrison, S. J., & Hewlins, M. J. E. (1998). An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(40), 25751–25756.
- Dickschat**, J. S., Bode, H. B., Wenzel, S. C., Müller, R., & Schulz, S. (2005a). Biosynthesis and identification of volatiles released by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *ChemBioChem*, *6*(11), 2023–2033.
- Dickschat**, J. S., Helmke, E., & Schulz, S. (2005b). Volatile organic compounds from arctic bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroids group: A retrobiosynthetic approach in chemotaxonomic investigations. *Chemistry and Biodiversity*, *2*(3), 318–353.
- Dickschat**, J. S., Martens, T., Brinkhoff, T., Simon, M., & Schulz, S. (2005c). Volatiles released by a Streptomyces species isolated from the North Sea. *Chemistry and Biodiversity*, *2*(7), 837–865.
- Dickschat**, J. S., Wenzel, S. C., Bode, H. B., Müller, R., & Schulz, S. (2004). Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *ChemBioChem*, *5*(6), 778–787.
- Djipto-Lordon**, C., & Dejean, A. (1999). Tropical arboreal ant mosaics: innate attraction and imprinting determine nest site selection in dominant ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *45*(October), 219–225.

- Dobritsa**, A. A., Van Der Goes Van Naters, W., Warr, C. G., Steinbrecht, R. A., & Carlson, J. R. (2003). Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 37(5), 827–841.
- Dombrovski**, M., & Condrón, B. (2020). Critical periods shaping the social brain: A perspective from *Drosophila*. *BioEssays*, 43(1).
- Droney**, D. C. (1994). Tests of hypotheses for lek formation in a Hawaiian *Drosophila*. In *Animal Behaviour* (Vol. 47, Issue 2, pp. 351–361).
- Dubnau**, J., Grady, L., Kitamoto, T., & Tully, T. (2001). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 411(May), 476–480.
- Dudai**, Y. (1985). Genes, enzymes and learning in *Drosophila*. *Trends Neurosci.*, 8, 18–21.
- Dumancic**, M. M., Oakeshott, J. G., Russell, R. J., & Healy, M. J. (1997). Characterization of the EstP protein in *Drosophila melanogaster* and its conservation in Drosophilids. *Biochemical Genetics*, 35(7–8), 251–271.
- Duménil**, C., Woud, D., Pinto, F., Alkema, J. T., Jansen, I., Van Der Geest, A. M., Roessingh, S., & Billeter, J. C. (2016). Pheromonal Cues Deposited by Mated Females Convey Social Information about Egg-Laying Sites in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Chemical Ecology*, 42(3), 259–269.
- Durisko**, Z., Kemp, R., Mubasher, R., & Dukas, R. (2014). Dynamics of social behavior in fruit fly larvae. *PLoS ONE*, 9(4), 1–8.
- Dweck**, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Farhan, A., Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2015). Olfactory proxy detection of dietary antioxidants in *Drosophila*. *Current Biology*, 25(4), 455–466.
- Dweck**, H. K. M., Ebrahim, S. A. M., Thoma, M., Mohamed, A. A. M., Keesey, I. W., Trona, F., Lavista-Llanos, S., Svatoš, A., Sachse, S., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2015). Pheromones mediating copulation and attraction in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E2829–E2835.
- Dziuban**, C. D., & Shirkey, E. C. (1974). When is a correlation matrix appropriate for factor analysis? Some decision rules. *Psychological Bulletin*, 81(6), 358–361.
- Edgecomb**, R. S., Harth, C. E., & Schneiderman, A. M. (1994). Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *Journal of Experimental Biology*, 197, 215–235.
- Ejima**, A. (2015). Pleiotropic actions of the male pheromone cis-vaccenyl acetate in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 201(9), 927–932.
- Ejima**, A., Smith, B. P. C., Lucas, C., van der Goes van Naters, W., Miller, C. J., Carlson, J. R., Levine, J. D., & Griffith, L. C. (2007). Generalization of Courtship Learning in *Drosophila* is Mediated by cis-Vaccenyl Acetate. *Current Biology*, 17(7), 599–605.

- Engels**, W. J. M., Alting, A. C., Arntz, M. M. T. G., Gruppen, H., Voragen, A. G. J., Smit, G., & Visser, S. (2000). Partial purification and characterization of two aminotransferases from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* B78 involved in the catabolism of methionine and branched-chain amino acids. *International Dairy Journal*, 10(7), 443–452.
- Errard**, C., Bagnères, A.-G., & Clément, J. L. (1989). Les signaux chimiques de la reconnaissance interspécifique chez les fourmis. *Insectes Sociaux*, 5, 285–292.
- Etienne**, R., Wertheim, B., Hemerik, L., Schneider, P., & Powell, J. (2002). The interaction between dispersal, the Allee effect and scramble competition affects population dynamics. *Ecological Modelling*, 148(2), 153–168.
- Everaerts**, C., Cazalé-debat, L., Louis, A., Pereira, E., Farine, J., Cobb, M., & Ferveur, J. (2018). Pre-imaginal conditioning alters adult sex pheromone response in *Drosophila*. *PeerJ*, 1–17.
- Everaerts**, C., Farine, J., & Cobb, M. (2010). *Drosophila* Cuticular Hydrocarbons Revisited : Mating Status Alters Cuticular Profiles. *Plos One*, 5(3), 1–12.
- Fan**, Y., Rafaeli, A., Moshitzky, P., Kubli, E., Choffat, Y., & Applebaum, S. W. (2000). Common functional elements of *Drosophila melanogaster* seminal peptides involved in reproduction of *Drosophila melanogaster* and *Helicoverpa armigera* females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(8–9), 805–812.
- Farine**, J. P., Cortot, J., & Ferveur, J. F. (2014). *Drosophila* adult and larval pheromones modulate larval food choice. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1784).
- Farine**, J. P., Ferveur, J. F., & Everaerts, C. (2012). Volatile *Drosophila* cuticular pheromones are affected by social but not sexual experience. *PLoS ONE*, 7(7), 11.
- Farkas**, S. R., & Shorey, H. H. (1972). Chemical trail-following by flying insects: A mechanism for orientation to a distant odor source. *Science*, 178(4056), 67–68.
- Fedina**, T. Y., Kuo, T. H., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., Yew, J. Y., & Pletcher, S. D. (2012). Dietary Effects on Cuticular Hydrocarbons and Sexual Attractiveness in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7(12), 1–11.
- Ferrandon**, D., Jung, A. C., Criqui, M. C., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO Journal*, 17(5), 1217–1227.
- Ferveur**, J. F. (2005). Cuticular hydrocarbons: Their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior Genetics*, 35(3), 279–295.
- Ferveur**, J. F., & Cobb, M. (2010). Behavioral and evolutionary roles of cuticular hydrocarbons in *Diptera*. In *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (pp. 325–343).
- Finch**, S., & Skinner, G. (1982). Upwind flight by the cabbage root fly, *Delia radicum*. *Physiological Entomology*, 7(4), 387–399.
- Fishilevich**, E., Domingos, A. I., Asahina, K., Naef, F., Vosshall, L. B., & Louis, M. (2005). Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Current Biology*, 15(23), 2086–2096.



- Fishilevich**, E., & Vosshall, L. B. (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Current Biology*, 15(17), 1548–1553.
- Flaven-Pouchon**, J., Garcia, T., Abed-Vieillard, D., Farine, J. P., Ferveur, J. F., & Everaerts, C. (2014). Transient and permanent experience with fatty acids changes *Drosophila melanogaster* preference and fitness. *PLoS ONE*, 9(3), 1–10.
- Folguera**, G., Ceballos, S., Spezzi, L., Fanara, J. J., & Hasson, E. (2008). Clinal variation in developmental time and viability, and the response to thermal treatments in two species of *Drosophila*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(2), 233–245.
- Fontan**, A., & Zerba, E. (1984). Integumental esteratic activity in *Triatoma infestans* and its contribution to the degradation of organophosphorus insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79(1), 183–188.
- Fowler**, G. L. (1973). Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: Sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Advances in Genetics*, 17(C), 293–360.
- Gage**, M. J. G., Macfarlane, C. P., Yeates, S., Ward, R. G., Searle, J. B., & Parker, G. A. (2004). Spermatozoal Traits and Sperm Competition in Atlantic Salmon: Relative Sperm Velocity Is the Primary Determinant of Fertilization Success. *Current Biology*, 14(January), 44–47.
- Galarreta**, M., & Hestrin, S. (2001). Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science*, 292(5525), 2295–2299.
- Galizia**, C. G., & Rössler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: Anatomy and function. *Annual Review of Entomology*, 55, 399–420.
- Gandolfi**, M., Mattiacci, L., & Dorn, S. (2003). Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1533), 2623–2629.
- Ganter**, P. F. (2006). Yeast and Invertebrate Associations. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 303–370).
- Geier**, M., Bosch, O., & Boeckh, J. (1999). Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. *Journal of Experimental Biology*, 202(12), 1639–1648.
- Gendre**, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M., & Stocker, R. F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development*, 131(1), 83–92.
- Gibbs**, A., & Pomonis, J. G. (1995). Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112(2), 243–249.
- Gilbert**, D. G. (1980). Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*, 46(1), 135–137.
- Golovin**, R. M., & Broadie, K. (2016). Developmental experience-dependent plasticity in the first synapse of the *Drosophila* olfactory circuit. *Journal of Neurophysiology*, 116(6), 2730–2738.

- Golovin**, R. M., Vest, J., Vita, D. J., & Broadie, K. (2019). Activity-Dependent Remodeling of *Drosophila* Olfactory Sensory Neuron Brain Innervation during an Early-Life Critical Period. *The Journal of Neuroscience*, 39(16), 2995–3012.
- Gosling**, L., & Roberts, S. (2001). Scent-Marking by Male Mammals: Cheat-Proof Signals to Competitors and Mates. *Advances in the Study of Behavior*, 30, 169–217.
- Gottschalk** G. (1986) Bacterial metabolism [chapter 8]. 2nd ed. Springer Verlag. p. 208–82.
- Gotz**, K. G. (1987). Course-control, metabolism and wing interference during ultralong tethered flight in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 128(1), 35–46.
- Grant**, P. R., & Grant, B. R. (2018). Role of sexual imprinting in assortative mating and premating isolation in Darwin's finches. *PNAS*, 115(46), 10879–10887.
- Greenspan**, R. J., & Ferveur, J. (2000). Courtship in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics*, 34, 205–232.
- Gregg**, T. G., McCrate, A., Reveal, G., Hall, S., & Rypstra, A. L. (1990). Insectivory and social digestion in *Drosophila*. *Biochemical Genetics*, 28(3–4), 197–207.
- Griffith**, L., & Ejima, A. (2009). Multimodal sensory integration of courtship stimulating cues in *Drosophila melanogaster*. *Annales of NY Academy of Sciences*, 1170(1), 394–398.
- Grinsted**, L., Bilde, T., & D'Ettoire, P. (2011). Cuticular hydrocarbons as potential kin recognition cues in a subsocial spider. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1187–1194.
- Grosjean**, Y., Rytz, R., Farine, J. P., Abuin, L., Cortot, J., Jefferis, G. S. X. E., & Benton, R. (2011). An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila*. *Nature*, 478(7368), 236–240.
- Grotewiel**, M. S., Beck, C. D. O., Wu, K. H., Zhu, X., & Davis, R. L. (1998). Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature*, 391(January), 455–460.
- Gutiérrez-Ibáñez**, C., Villagra, C. A., & Niemeyer, H. M. (2007). Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften*, 94(7), 595–600.
- Hall**, J. (1979). Control of male reproductive behavior by the central nervous system of *Drosophila*: dissection of a courtship pathway by genetic mosaics. *Genetics*, 92(2), 437–457.
- Hallem**, E. A., Ho, M. G., & Carlson, J. R. (2004). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 117(7), 965–979.
- Hamilton**, W. D. (1971). Geometry for the selfish herd. *Journal of Theoretical Biology*, 31(2), 295–311.
- Haverty**, M. I., Page, M., Nelson, L. J., & Blomquist, G. J. (1988). Cuticular hydrocarbons of dampwood termites, *Zootermopsis*: Intra- and intercolony variation and potential as taxonomic characters. *Journal of Chemical Ecology*, 14(3), 1035–1058.

- He**, X., Tzotzos, G., Woodcock, C., Pickett, J. A., Hooper, T., Field, L. M., & Zhou, J. J. (2010). Binding of the General Odorant Binding Protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the Moth Sex Pheromone Components. *Journal of Chemical Ecology*, 36(12), 1293–1305.
- Hedlund**, K. (1996). Aggregation pheromones of *Drosophila* immigrant, *D. phalerata*, and *D. subobscura*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(10), 1835–1844.
- Hedlund**, K., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (1996). Generalist and Specialist Parasitoid Strategies of Using Odours of Adult Drosophilid Flies When Searching for Larval Hosts. *Oikos*, 77(3), 390.
- Heimbeck**, G., Bugnon, V., Gendre, N., Häberlin, C., & Stocker, R. F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: Toxin expression studies in chemosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(15), 6599–6609.
- Heinrichs**, V., Ryner, L. C., & Baker, B. S. (1998). Regulation of Sex-Specific Selection of fruitless 5' Splice Sites by transformer and transformer-2. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 450–458.
- Heisenberg**, M., Borst, A., Wagner, S., & Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *Journal of Neurogenetics*, 2(1), 1–30.
- Hellegruber**, C., Dötterl, S., Ruprecht, U., & Junker, R. R. (2017). Epiphytic Bacteria Alter Floral Scent Emissions. *Journal of Chemical Ecology*, 43(11–12), 1073–1077.
- Hensch**, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(December), 877–888.
- Herndon**, L. A., & Wolfner, M. F. (1995). A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10114–10118.
- Hess**, E. H. (1959). Imprinting. *Science*, 130(3368), 133–141.
- Hess**, E. H. (1964). Imprinting in birds. *Science*, 146(3648), 1128–1139.
- Höckelmann**, C., & Jüttner, F. (2004). Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of *Calothrix* and *Plectonema*. *Water Science and Technology*, 49(9), 47–54.
- Höckelmann**, Claudia, Moens, T., & Jüttner, F. (2004). Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography*, 49(5), 1809–1819.
- Hoffman**, H. S. (1978). Experimental analysis of imprinting and its behavioral effects. In *The Psychology of learning and motivation* (p. 37).
- Houot**, B., Cazalé-Debat, L., Fraichard, S., Everaerts, C., Saxena, N., Sane, S. P., & Ferveur, J. (2017). Gene Regulation and Species-Specific Evolution of Free Flight Odor Tracking in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 35(1), 3–15.

- Howard**, R. W. (2001). Cuticular Hydrocarbons of Adult *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae) and Two Larval Hosts, Angoumois Grain Moth (Lepidoptera: Gelechiidae) and Cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(1), 152–158.
- Howard**, R. W., & Blomquist, G. J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol*, 50, 371–393.
- Huang**, J., Cardoza, Y. J., Schmelz, E. A., Raina, R., Engelberth, J., & Tumlinson, J. H. (2003). Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 217(5), 767–775.
- Immelmann**, K. (1975a). Ecological significance of imprinting and early learning. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 6, 15–37.
- Immelmann**, K. (1975b). The influence of early experience upon the development of social behavior in *Estrildine* finches. *American Federation of Aviculture*, 2.3, 8–10.
- Irwin**, D. E., & Price, T. (1999). Sexual imprinting, learning and speciation. *Heredity*, 82(4), 347–354.
- Isingrini**, M., Lenoir, A., & Jaisson, P. (1985). Preimaginal learning as a basis of colony-brood recognition in the ant *Cataglyphis cursor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(24), 8545–8547.
- Jabr**, F. (2012). How Does a Caterpillar Turn into a Butterfly. *Scientific American*.
- Jackson**, L. L. (1970). Cuticular lipids of insects: II. Hydrocarbons of the cockroaches *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea* and *Periplaneta fuliginosa*. *Lipids*, 5(1), 38–41.
- Jaenike**, J. (1982). Environmental modification of oviposition behavior in *Drosophila*. *The American Naturalist*, 119(6), 784–802.
- Jaenike**, John. (1983). Induction of host preference in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia*, 58(3), 320–325.
- Jaenike**, John, Bartelt, R., Huberty, A., Thibault, S., & Libler, J. (1992). Aggregations in Mycophagous *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Candidate Pheromones and Field Responses. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(6), 696–704.
- Jaenike**, John, & James, A. (1991). Aggregation and the Coexistence of Mycophagous *Drosophila*. *British Ecological Society*, 60(3), 913–928.
- Jaisson**, P. (1973). L'impregnation dans l'ontogenese des comportements de soins aux cocons chez la jeune fourmi rousse (*Formica polyctena* Forst.). *Behaviour*, II, 35.
- Jallon**, J. M. (1984). A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating. *Behavior Genetics*, 14(5), 441–478.
- James**, A. C., & Partridge, L. (1998). Geographic variation in competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist*, 151(6), 530–537.
- Jang**, E. B., Light, D. M., Binder, R. G., Flath, R. A., & Carvalho, L. A. (1994). Attraction of female mediterranean fruit flies to the five major components of male-produced pheromone in a laboratory flight tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, 20(1), 9–20.

- Jin**, X., Tal, S. H., & Smith, D. P. (2008). SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10996–11001.
- Johansson**, B., & Jones, T. (2007). The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews*, 82(2), 265–289.
- Johansson**, B., Jones, T., & Widemo, F. (2005). Cost of pheromone production in a lekking *Drosophila*. *Animal Behaviour*, 69(4), 851–858.
- Johnson**, M. H., & Horn, G. (1988). Development of filial preferences in dark-reared chicks. *Animal Behaviour*, 36, 675–683.
- Joiner**, W. J., Crocker, A., White, B. H., & Sehgal, A. (2006). Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature*, 441(June), 757–760.
- Jones**, G. P., Millcich, M. J., Emsile, M. J., & Lunow, C. (1999). Self-recruitment in a coral fish population. *Nature*, 402(6763), 802–804.
- Junker**, R. R., & Tholl, D. (2013). Volatile Organic Compound Mediated Interactions at the Plant-Microbe Interface. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 810–825.
- Kaissling**, K. E. (1974). Biochemistry of Sensory Functions. In *Biochemistry of Sensory Functions* (Issue January 1974, pp. 243–273).
- Kaissling**, K. E. (1998). Pheromone deactivation catalyzed by receptor molecules: A quantitative kinetic model. *Chemical Senses*, 23(4), 385–395.
- Kalb**, J., Dibenedetto, A., & Wolfner, M. (1993). Probing the function of *Drosophila melanogaster* accessory glands by directed cell ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8093–8097.
- Kandler**, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209–224.
- Kannan**, K., Galizia, G., & Nouvian, M. (2022). Olfactory Strategies in the Defensive Behaviour of Insects. *Insects*, 13(5), 1–20.
- Karlson**, P., & Lüscher, M. (1959). “Pheromones”: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature*, 183(4653), 55–56.
- Karowe**, D. N. (1989). Facultative monophagy as a consequence of prior feeding experience: behavioral and physiological specialization in *Colias philodice* larvae. *Oecologia*, 78(1), 106–111.
- Kather**, R., & Martin, S. J. (2015). Evolution of Cuticular Hydrocarbons in the Hymenoptera: a Meta-Analysis. *Journal of Chemical Ecology*, 41(10), 871–883.
- Keeseey**, I. W., & Hansson, B. S. (2022). Neuroecology of Alcohol Preference in *Drosophila*. *Annual Review of Entomology*, 67(February), 261–279.
- Keeseey**, I. W., Koerte, S., Retzke, T., Haverkamp, A., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2016). Adult Frass Provides a Pheromone Signature for *Drosophila* Feeding and Aggregation. *Journal of Chemical Ecology*, 42(8), 739–747.
- Kim**, M. S., Repp, A., & Smith, D. P. (1998). LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 150(2), 711–721.

- Kimura**, K. I., Ote, M., Tazawa, T., & Yamamoto, D. (2005). Fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain. *Nature*, 438(7065), 229–233.
- Kimura**, K. ichi, Hachiya, T., Koganezawa, M., Tazawa, T., & Yamamoto, D. (2008). Fruitless and Doublesex Coordinate to Generate Male-Specific Neurons that Can Initiate Courtship. *Neuron*, 59(5), 759–769.
- Kingsford**, Michael J., L., Jeffrey M., S., Alan, L., Kenyon C., M., G., S., & Pineda, J. (2002). Sensory environments, larval abilities and local self-recruitment. *Bulletin of Marine Science*, 1(70), 309–340.
- Kiviranta**, H. Tuomainen, A. Reiman, M. Laitinen, S. Liesivuori, J. Nevalainen, A. (1998). Qualitative identification of volatile metabolites from two fungi and three bacteria species cultivated on two media *Cent Eur J Public Health*, 6(4), 296-9.
- Knudsen**, G. K., Tasin, M., Aak, A., & Thöming, G. (2018). A wind tunnel for odor mediated insect behavioural assays. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(141), 1–8.
- Kohl**, J., Ostrovsky, A. D., Frechter, S., & Jefferis, G. S. X. E. (2013). A Bidirectional Circuit Switch Reroutes Pheromone Signals in Male and Female Brains. *Cell*, 155(7), 1610–1623.
- Kokko**, H. (1997). The lekking game: Can female choice explain aggregated male displays? *Journal of Theoretical Biology*, 187(1), 57–64.
- Komarov**, N., & Sprecher, S. G. (2022). The chemosensory system of the *Drosophila* larva: an overview of current understanding. *Fly*, 16(1), 1–12.
- Krings**, U., Hinz, M., & Berge, R. G. (1996). Degradation of [2H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *Journal of Biotechnology*, 51(2), 123–129.
- Krupp**, J. J., Nayal, K., Wong, A., Millar, J. G., & Levine, J. D. (2020). Desiccation resistance is an adaptive life-history trait dependent upon cuticular hydrocarbons, and influenced by mating status and temperature in *D. melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 121(April 2019), 11.
- Kubli**, E. (2003). Sex-peptides: Seminal peptides of the *Drosophila* male. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(8), 1689–1704.
- Kunz**, T., Kraft, K. F., Technau, G. M., & Urbach, R. (2012). Origin of *Drosophila* mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development*, 139, 2510–2522.
- Kuo**, T. H., Yew, J., Fedina, T., Dreisewerd, K., Dierick, H., & Pletcher, S. (2012). Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 215(5), 814–821.
- Kurtovic**, A., Widmer, A., & Dickson, B. J. (2007). A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature*, 446(7135), 542–546.
- Laissue**, P. P., Reiter, C., Hiesinger, P. R., Halter, S., Fischbach, K. F., & Stocker, R. F. (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 405(4), 543–552.

- Lamprecht**, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 45–54.
- Lapadatescu**, C., Giniès, C., Le Quéré, J. L., & Bonnarne, P. (2000). Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1517–1522.
- Larsen**, C., Shy, D., Spindler, S. R., Fung, S., Pereanu, W., Younossi-hartenstein, A., & Hartenstein, V. (2009). Patterns of growth, axonal extension and axonal arborization of neuronal lineages in the developing *Drosophila* brain. *Developmental Biology*, 335(2), 289–304.
- Larsson**, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., & Vosshall, L. B. (2004). Or83b Encodes a Broadly Expressed Odorant Receptor Essential for *Drosophila* Olfaction. *Neuron*, 43(Septembre), 703–714.
- Laturney**, M., & Billeter, J. C. (2016). *Drosophila melanogaster* females restore their attractiveness after mating by removing male anti-aphrodisiac pheromones. *Nature Communications*, 7, 1–11.
- Laughlin**, J. D., Ha, T. S., Jones, D. N. M., & Smith, D. P. (2008). Activation of Pheromone-Sensitive Neurons Is Mediated by Conformational Activation of Pheromone-Binding Protein. *Cell*, 133(7), 1255–1265.
- Law**, J. H., & Regnier, F. E. (1971). Pheromones. *Annu. Rev. Biochem*, 40, 533–548.
- Lebreton**, Sebastien, Borrero-Echeverry, F., Gonzalez, F., Solum, M., Wallin, E., Hedenström, E., Hansson, B., Gustavsson, A. L., Bengtsson, M., Birgersson, G., Walker, W., Dweck, H., Becher, P., & Witzgall, P. (2017). A *Drosophila* female pheromone elicits species-specific long-range attraction via an olfactory channel with dual specificity for sex and food. *BMC Biology*, 15(88), 1–14.
- Lebreton**, Sébastien, Grabe, V., Omondi, A., Ignell, R., Becher, P., Hansson, B., Sachse, S., & Witzgall, P. (2014). Love makes smell blind: Mating suppresses pheromone attraction in *Drosophila* females via Or65a olfactory neurons. *Scientific Reports*, 4, 1–6.
- Lebreton**, Sébastien, Trona, F., Borrero Echeverry, F., Bilz, F., Grabe, V., Becher, P., Carlsson, M., Nässel, D., Hansson, B., Sachse, S., & Witzgall, P. (2015). Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. *Scientific Reports*, 5, 1–11.
- Lee**, G., Foss, M., Goodwin, S. F., Carlo, T., Taylor, B. J., & Hall, J. C. (2000). Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the fruitless gene in the *Drosophila* central nervous system. *Journal of Neurobiology*, 43(4), 404–426.
- Lee**, T., Lee, A., & Luo, L. (1999). Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development*, 126, 4065–4076.
- Leftwich**, P. T., Clarke, N. V. E., Hutchings, M. I., & Chapman, T. (2017). Gut microbiomes and reproductive isolation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), 12767–12772.
- Lei**, H., Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (2004). Spatial and temporal organization of ensemble representations for different odor classes in the moth antennal lobe. *Journal of Neuroscience*, 24(49), 11108–11119.

- Leitch**, K. J., Ponce, F. V., Dickson, W. B., Van Breugel, F., & Dickinson, M. H. (2021). The long-distance flight behavior of *Drosophila* supports an agent-based model for wind-assisted dispersal in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(17).
- Leon**, M., Galef, B. G., & Behse, J. H. (1977). Establishment of pheromonal bonds and diet choice in young rats by odor pre-exposure. *Physiology and Behavior*, 18(3), 387–391.
- Leon**, M., & Moltz, H. (1971). Maternal pheromone: Discrimination by pre-weanling albino rats. *Physiology and Behavior*, 7(2), 265–267.
- Leon**, M., & Moltz, H. (1972). The development of the pheromonal bond in the albino rat. *Physiology and Behavior*, 8(4), 683–686.
- Letsinger**, J. T., & Gromko, M. H. (1985). The role of sperm numbers in sperm competition and female remating in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 66(3), 195–202.
- Levin**, L. R., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L., & Reed, R. R. (1992). The *Drosophila* Learning and Memory Gene *rutabaga* Encodes a Adenylyl Cyclase. *Cell*, 68(February), 479–489.
- Lienhard**, M. C., & Stocker, R. F. (1991). The development of the sensory neuron pattern in the antennal disc of wild-type and mutant (*lz 3*, *ss\**) *Drosophila melanogaster*. *Development*, 112, 1063–1075.
- Lin**, C.-C., & Potter, C. J. (2015). Re-classification of *Drosophila melanogaster* trichoid and intermediate sensilla using fluorescence-guided single sensillum recording. *PLoS ONE*, 10(10), 1–14.
- Lin**, C., Prokop-Prigge, K., Preti, G., & Potter, C. (2015). Food odors trigger *Drosophila* males to deposit a pheromone that guides aggregation and female oviposition decisions. *ELife*, 4.
- Lin**, H. H., Cao, D. S., Sethi, S., Zeng, Z., Chin, J. S. R., Chakraborty, T. S., Shepherd, A. K., Nguyen, C. A., Yew, J. Y., Su, C. Y., & Wang, J. W. (2016). Hormonal Modulation of Pheromone Detection Enhances Male Courtship Success. *Neuron*, 90, 1272–1285.
- Liu**, W., Liang, X., Gong, J., Yang, Z., Zhang, Y. H., Zhang, J. X., & Rao, Y. (2011). Social regulation of aggression by pheromonal activation of Or65a olfactory neurons in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 14(7), 896–902.
- Liu**, X., & Davis, R. L. (2009). The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nature Neuroscience*, 12(January), 53–59.
- Lopes**, V. F., Cabral, H., Machado, L. P. B., & Mateus, R. P. (2014). Purification and characterization of a specific late-larval esterase from two species of the *Drosophila repleta* group: Contributions to understand its evolution. *Zoological Studies*, 53(1), 1–11.
- Lorenz**, K. (1935). The Companion in the Bird's World. *Journal of Field Ornithology*, 83, 245–273.
- Lorenz**, K. (1950). The comparative method in studying innate behavior patterns. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 4, 221–268.



- Lubischer**, J. L., Verhegge, L. D., & Weeks, J. C. (1999). Respecified larval proleg and body wall muscles circulate hemolymph in developing wings of *Manduca sexta* pupae. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 787–796.
- Lung**, O., Kuo, L., & Wolfner, M. F. (2001). *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *Journal of Insect Physiology*, 47(6), 617–622.
- Lung**, O., & Wolfner, M. F. (2001). Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(6–7), 543–551.
- Lung**, Oliver, & Wolfner, M. F. (1999). *Drosophila* seminal fluid proteins enter the circulatory system of the mated female fly by crossing the posterior vaginal wall. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(12), 1043–1052.
- MacLeod**, P., & Morgan, M. E. (1955). Leucine Metabolism of *Streptococcus lactis* Var. maltigenes. I. Conversion of Alpha-Ketoisocaproic Acid to Leucine and 3-Methylbutanal. *Journal of Dairy Science*, 38(11), 1208–1214.
- Malnic**, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713–723.
- Mane**, S. D., Tompkins, L., & Richmond, R. C. (1983). Male esterase 6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science*, 222(4622), 419–421.
- Manning**, A. (1962). A sperm factor affecting the receptivity of *Drosophila melanogaster* females. *Nature*, 194(April), 252–253.
- Manning**, A. (1967a). “Pre-imaginal Conditioning” in *Drosophila*. *Nature*, 216(October 28), 338–340.
- Manning**, A. (1967b). The control of sexual receptivity in female *Drosophila*. *Animal Behaviour*, 15(2–3), 239–250.
- Manoli**, D. S., Foss, M., Villella, A., Taylor, B. J., Hall, J. C., & Baker, B. S. (2005). Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature*, 436(7049), 395–400.
- Mao**, Z., & Davis, R. L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits*, 3(JUL), 1–17.
- Markow**, T. A. (2015). The secret lives of *Drosophila* flies. *ELife*, 4(JUNE), 1–9.
- Markow**, T. A., & O’Grady, P. M. (2006). *Drosophila* A guide to species identification and use. In *Academic Press*.
- Martin**, S. J., & Drijfhout, F. P. (2009). Nestmate and task cues are influenced and encoded differently within ant cuticular hydrocarbon profiles. *Journal of Chemical Ecology*, 35(3), 368–374.
- Martin**, S. J., Helanterä, H., & Drijfhout, F. P. (2008). Colony-specific hydrocarbons identify nest mates in two species of *Formica* ant. *Journal of Chemical Ecology*, 34(8), 1072–1080.
- Masson**, F., Hinrichsen, L., Talon, R., & Montel, M. C. (1999). Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 49(3), 173–178.

- Mast**, J., De Moraes, C., Alborn, H., Lavis, L., & Stern, D. (2014). Evolved differences in larval social behavior mediated by novel pheromones. *ELife*, 3, e04205.
- Masuda-Nakagawa**, L. M., Tanaka, N. K., & O’Kane, C. J. (2005). Stereotypic and random patterns of connectivity in the larval mushroom body calyx of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19027–19032.
- Mateus**, R., Machado, L. P. B., & Ceron, C. (2011). Gene Duplication and Subsequent Differentiation of Esterases in Cactophilic *Drosophila* Species. In *Gene Duplication* (Issue October, p. 400).
- McBride**, S. M. J., Giuliani, G., Choi, C., Krause, P., Correale, D., Watson, K., Baker, G., & Siwicki, K. K. (1999). Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, 24(4), 967–977.
- McKenzie**, J. A., & Parsons, P. A. (1972). Alcohol tolerance: An ecological parameter in the relative success of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Oecologia*, 10(4), 373–388.
- McKeown**, M., Belote, J., & Baker, B. S. (1987). A molecular analysis of transformer, a gene in *Drosophila melanogaster* that controls female sexual differentiation. *Cell*, 48(February), 489–499.
- Mercier**, D., Tsuchimoto, Y., Ohta, K., & Kazama, H. (2018). Olfactory Landmark-Based Communication in Interacting *Drosophila*. *Current Biology*, 28(16), 2624–2631.e5.
- Miller**, D. F. B., Holtzman, S. L., & Kaufman, T. C. (2002). Customized microinjection glass capillary needles for P-element transformations in *Drosophila melanogaster*. *BioTechniques*, 33(2), 366–375.
- Min**, S., Ai, M., Shin, S. A., & Suh, G. S. B. (2013). Dedicated olfactory neurons mediating attraction behavior to ammonia and amines in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), 1321–1329.
- Møller**, J. K. S., Hinrichsen, L. L., & Andersen, H. J. (1998). Formation of amino acid (L-leucine, L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 101–117.
- Monnin**, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Finnish Zoological and Botanical Publishing Board*, 43(5), 515–530.
- Monsma**, S. A., Harada, H. A., & Wolfner, M. F. (1990). Synthesis of two *Drosophila* male accessory gland proteins and their fate after transfer to the female during mating. *Developmental Biology*, 142(2), 465–475.
- Montigny**, D., Coureaud, G., & Schaal, B. (2006). Rabbit pup response to the mammary pheromone: From automatism to prandial control. *Physiology and Behavior*, 89(5), 742–749.
- Moshitzky**, P., Fleischmann, I., Chaimov, N., Saudan, P., Klausner, S., Kubli, E., & Applebaum, S. W. (1996). Sex-Peptide Activates Juvenile Hormone Biosynthesis in the *Drosophila melanogaster* Corpus Allatum. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32(3–4), 363–374.

- Murgier**, J., Everaerts, C., Farine, J. P., & Ferveur, J. F. (2019). Live yeast in juvenile diet induces species-specific effects on *Drosophila* adult behaviour and fitness. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Murlis**, J., Elkinton, J., & Carde, R. (1992). Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology*, 37, 505–532.
- Nakanishi**, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. (2010). Sex-Specific Antennal Sensory System in the Ant *Camponotus japonicus*: Glomerular Organizations of Antennal Lobes. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(2), 2186–2201.
- Narasimha**, S., Nagornov, K. O., Menin, L., Mucciolo, A., Rohwedder, A., Humbel, B. M., Stevens, M., Thum, A. S., Tsybin, Y. O., & Vijendravarma, R. K. (2019). *Drosophila melanogaster* cloak their eggs with pheromones, which prevents cannibalism. *PLoS Biology*, 17(1), 1–22.
- Neubaum**, D. M., & Wolfner, M. F. (1999). Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics*, 153(2), 845–857.
- Ng**, M., Roorda, R. D., Lima, S. Q., Zemelman, B. V., Morcillo, P., & Miesenböck, G. (2002). Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron*, 36(3), 463–474.
- Nierop Groot**, M. N., & De Bont, J. A. M. (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3009–3013.
- Nolte**, A., Funk, N. W., Mukunda, L., Gawalek, P., & Werckenthin, A. (2013). In situ Tip-Recordings Found No Evidence for an Orco-Based Ionotropic Mechanism of Pheromone- Transduction in *Manduca sexta*. *PLoS ONE*, 8(May), 9.
- Nunney**, L. (1996). The Colonization of Oranges by the Cosmopolitan *Drosophila*. *Oecologia*, 108(3), 552–561.
- Otte**, D. (1974). Effects and Functions in the Evolution of Signaling Systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 385–417.
- Ottiger**, M., Soller, M., Stocker, R. F., & Kubli, E. (2000). Binding sites of *Drosophila melanogaster* sex peptide pheromones. *Journal of Neurobiology*, 44(1), 57–71.
- Overdeck**, L. (2022). From Bug Soup to Butterfly. Bedtime Math Foundation.
- Palanca**, L., Gaskett, A. C., Günther, C. S., Newcomb, R. D., & Goddard, M. R. (2013). Quantifying Variation in the Ability of Yeasts to Attract *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 8(9), 1–10.
- Parker**, G. A. (1993). Sperm competition games: Sperm size and sperm number under adult control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 253(1338), 245–254.
- Pascual**, A., & Prémat, T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science*, 294(November), 1115–1117.
- Pattarini**, J. M., Starmer, W. T., Bjork, A., & Pitnick, S. (2006). Mechanisms Underlying the Sperm Quality Advantage in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60(10), 2064.

- Pauls**, D., Selcho, M., Gendre, N., Stocker, R. F., & Thum, A. S. (2010). *Drosophila* Larvae Establish Appetitive Olfactory Memories via Mushroom Body Neurons of Embryonic Origin. *The Journal of General Physiology*, 30(32), 10655–10666.
- Pechine**, J. M., Perez, F., Antony, C., & Jallon, J. M. (1985). A further characterization of *Drosophila* cuticular monoenes using a mass spectrometry method to localize double bonds in complex mixtures. *Analytical Biochemistry*, 145, 177–182.
- Pedersen**, P. E., & Blass, E. M. (1982). Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Developmental Psychobiology*, 15(4), 349–355.
- Peñuelas**, J., Farré-Armengol, G., Llusia, J., Gargallo-Garriga, A., Rico, L., Sardans, J., Terradas, J., & Filella, I. (2014). Removal of floral microbiota reduces floral terpene emissions. *Scientific Reports*, 4, 2–5.
- Peralta Quesada**, P. C., & Schausberger, P. (2012). Prenatal Chemosensory Learning by the Predatory Mite *Neoseiulus californicus*. *PLoS ONE*, 7(12), 1–6.
- Perez-Orive**, J., Mazor, O., Turner, G. C., Cassenaer, S., Wilson, R. I., & Laurent, G. (2002). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science*, 297(5580), 359–365.
- Pitman**, J. L., McGill, J. J., Keegan, K. P., & Allada, R. (2006). A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature*, 441(7094), 753–756.
- Pollak**, F. C., & Berger, R. G. (1996). Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1295–1299.
- Prestwich**, G. D., Du, G., & Laforest, S. (1995). How is pheromone specificity encoded in proteins? *Chemical Senses*, 20(4), 461–469.
- Prokopy**, R. J., Averill, A. L., Cooley, S. S., & Roitberg, C. A. (1982). Associative learning in egg-laying site selection by apple maggot flies. *Science*, 218(4567), 76–77.
- Prokopy**, R. J., & Roitberg, B. D. (2001). Joining and avoidance behavior in nonsocial insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 46, 631–665.
- Pulver**, S. R., & Berni, J. (2012). The fundamentals of flying: Simple and inexpensive strategies for employing *Drosophila* genetics in neuroscience teaching laboratories. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 11(1), 139–148.
- Python**, F., & Stocker, R. F. (2002). Immunoreactivity against choline acetyltransferase,  $\gamma$ -aminobutyric acid, histamine, octopamine, and serotonin in the larval chemosensory system of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 157–167.
- Quinn**, W. G., Harris, W. A., & Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(3), 708–712.
- Radhakrishnan**, P., & Fedorka, K. M. (2011). Influence of female age, sperm senescence and multiple mating on sperm viability in female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(6), 778–783.

- Ramaekers**, A., Magnenat, E., Marin, E. C., Gendre, N., Jefferis, G. S. X. E., Luo, L., & Stocker, R. F. (2005). Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Current Biology*, 15(11), 982–992.
- Ramirez-Lucas**, P., Rochat, D., & Zagatti, P. (1996). Field trapping of *Metamasius hemipterus* with synthetic aggregation pheromone. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80(3), 453–460.
- Rand**, M. D., Kearney, A. L., Dao, J., & Clason, T. (2010). Permeabilization of *Drosophila* embryos for introduction of small molecules. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(11), 792–804.
- Ray**, S. (1999). Survival of olfactory memory through metamorphosis in the fly *Musca domestica*. *Neuroscience Letters*, 259(1), 37–40.
- Reinhardt**, K. (2007). Evolutionary consequences of sperm cell aging. *The Quarterly Review of Biology*, 82(4), 375–393.
- Ribeiro**, C., & Dickson, B. J. (2010). Sex peptide receptor and neuronal TOR/S6K signaling modulate nutrient balancing in *Drosophila*. *Current Biology*, 20(11), 1000–1005.
- Rice**, G., David, J. R., Kamimura, Y., Masly, J. P., Mcgregor, A. P., Nagy, O., Noselli, S., Nunes, M. D. S., O’Grady, P., Sánchez-Herrero, E., Siegal, M. L., Toda, M. J., Rebeiz, M., Courtier-Orgogozo, V., & Yassin, A. (2019). A standardized nomenclature and atlas of the male terminalia of *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 13(1–4), 51–64.
- Riddiford**, L. M. (1978). Ecdysone-Induced Change in Cellular Commitment of the Epidermis of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*, at the Initiation of Metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 34, 438–446.
- Ridley**, E. V., Wong, A. C. N., & Douglas, A. E. (2013). Microbe-dependent and nonspecific effects of procedures to eliminate the resident microbiota from *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3209–3214.
- Ridley**, E. V., Wong, A. C. N., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 7(5).
- Rietdorf**, K., & Steidle, J. (2002). Was Hopkins right? Influence of larval and early adult experience on the olfactory response in the granary weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera, Curculionidae). *Physiological Entomology*, 27(3), 223–227.
- Rizzi**, G. P. (1988). Formation of Pyrazines from Acyloin Precursors under Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 349–352.
- Robacker**, D. C., Lauzon, C. R., & He, X. (2004). Volatiles production and attractiveness to the mexican fruit fly of *Enterobacter agglomerans* isolated from apple maggot and mexican fruit flies. *Journal of Chemical Ecology*, 30(7), 1329–1347.
- Robacker**, D., Martinez, A., Garcia, J., & Bartelt, R. (1998). Volatiles Attractive to the Mexican Fruit Fly (Diptera : Tephritidae) from Eleven Bacteria Taxa. *The Florida Entomologist*, 81(4), 497–508.

- Roberts**, D. B. (2006). *Drosophila melanogaster*: The model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121(2), 93–103.
- Rolff**, J., Johnston, P. R., & Reynolds, S. (2019). Complete metamorphosis of insects. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 374, 8.
- Rosa-salva**, O., Regolin, L., & Vallortigara, G. (2010). Faces are special for newly hatched chicks: evidence for inborn domain-specific mechanisms underlying spontaneous preferences for face-like stimuli. *Developmental Science*, 13(4), 565–577.
- Rosenblatt**, J. S. (1983). Olfaction mediates developmental transition in the altricial newborn of selected species of mammals. *Developmental Psychobiology*, 16(5), 347–375.
- Rubinstein**, D. C., & Wolfner, M. F. (2014). Reproductive hacking: A male seminal protein acts through intact reproductive pathways in female *Drosophila*. *Fly*, 8(2), 80–85.
- Rudy**, J. W., & Cheatele, M. D. (1977). Odor-aversion learning in neonatal rats. *Science*, 198(4319), 845–846.
- Ryu**, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017–1026.
- Sakaguchi**, H., & Suzuki, M. G. (2013). *Drosophila melanogaster* larvae control amylase secretion according to the hardness of food. *Frontiers in Physiology*, 4(200), 15–18.
- Sakai**, T., & Kitamoto, T. (2006). Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. *Journal of Neurobiology*, 66(8), 821–834.
- Salzen**, E. A. (1967). Imprinting in Birds and Primates. *Behaviour*, 28(3–4), 232–254.
- Samakovlis**, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engstrom, A., & Hultmark, D. (1991). The Andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal*, 10(1), 163–169.
- Sandoz**, J. C., Laloi, D., Odoux, J. F., & Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Animal Behaviour*, 59(5), 1025–1034.
- Sandoz**, J. C., Pham-Delègue, M. H., Renou, M., & Wadhams, L. J. (2001). Asymmetrical generalisation between pheromonal and oral odours in appetitive olfactory conditioning of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative and Physiologie A*, 187, 559–568.
- Sato**, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Voss hall, L. B., & Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. 452(April).
- Saudan**, P., Hauck, K., Soller, M., Choffat, Y., Ottiger, M., Spörri, M., Ding, Z., Hess, D., Gehrig, P. M., Klauser, S., Hunziker, P., & Kubli, E. (2002). Ductus ejaculatorius peptide 99B (DUP99B), a novel *Drosophila melanogaster* sex-peptide pheromone. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 989–997.

- Savarit**, F., & Ferveur, J. F. (2002a). Genetic study of the production of sexually dimorphic cuticular hydrocarbons in relation with the sex-determination gene transformer in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research*, 79(1), 23–40.
- Savarit**, F., & Ferveur, J. F. (2002b). Temperature affects the ontogeny of sexually dimorphic cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 205(20), 3241–3249.
- Schaal**, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 424(6944), 68–72.
- Schaner**, A. M., Bartelt, R. J., & Jackson, L. L. (1987). (Z)-11-octadecenyl acetate, an aggregation pheromone in *Drosophila simulans*. *Journal of Chemical Ecology*, 13(7), 1777–1786.
- Schaner**, A. M., Benner, A. M., Leu, R. D., & Jackson, L. L. (1989). Aggregation pheromone of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila yakuba*, and *Drosophila rajasekari*. *Journal of Chemical Ecology*, 15(4), 1249–1257.
- Schaner**, A. M., Graham, K. J., & Jackson, L. L. (1989). Aggregation pheromone characterization and comparison in *Drosophila ananassae* and *Drosophila bipectinata*. *Journal of Chemical Ecology*, 15(3), 1045–1055.
- Schein**, M. W. (1963). On the Irreversibility of imprinting. *Z. f. Tierpsychol.*, 20(4), 462–467.
- Schöller**, C. E. G., Gürtler, H., Pedersen, R., Molin, S., & Wilkins, K. (2002). Volatile metabolites from actinomycetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2615–2621.
- Schulz**, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814–842.
- Schulz**, S., Fuhlendorff, J., & Reichenbach, H. (2004). Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron*, 60(17), 3863–3872.
- Schwaerzel**, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 23(33), 10495–10502.
- Sehdev**, A., Mohammed, Y. G., Triphan, T., & Szyszka, P. (2019). Olfactory Object Recognition Based on Fine-Scale Stimulus Timing in *Drosophila*. *IScience*, 13, 113–124.
- Sengpiel**, F. (2007). The critical period. *Current Biology*, 17(17), R742–R743.
- Sengupta**, S., & Smith, D. P. (2014). How *Drosophila* Detect Volatile Pheromones Signaling, Circuits, and Behavior. In *Neurobiology of Chemical Communication* (p. 30pp).
- Shanbhag**, S., Müller, B., & Steinbrecht, R. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Intl J Ins Morph Emb*, 28(1999), 377–397.

- Shanbhag**, S. R., Smith, D. P., & Steinbrecht, R. A. (2005). Three odorant-binding proteins are co-expressed in sensilla trichodea of *Drosophila melanogaster*. *Arthropod Structure and Development*, 34(2), 153–165.
- Shang**, Y., Claridge-Chang, A., Sjulson, L., Pypaert, M., & Miesenböck, G. (2007). Excitatory Local Circuits and Their Implications for Olfactory Processing in the Fly Antennal Lobe. *Cell*, 128(3), 601–612.
- Sharkey**, C. R., Blanco, J., Leibowitz, M. M., Pinto-Benito, D., & Wardill, T. J. (2020). The spectral sensitivity of *Drosophila* photoreceptors. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
- Sharma**, M. D., Mitchell, C., Hunt, J., Tregenza, T., & Hosken, D. J. (2012). The genetics of cuticular hydrocarbon profiles in the fruit fly *Drosophila simulans*. *Journal of Heredity*, 103(2), 230–239.
- Sheehan**, K., Richmond, R. C., & Cochrane, B. J. (1979). Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. *Insect Biochemistry*, 9(5), 443–450.
- Shelly**, T. E. (1990). Waiting for mates: variation in female encounter rates within and between leks of *Drosophila conformis*. *Behaviour*, 107, 34–48.
- Shelly**, T. E. (2001). Lek size and female visitation in two species of tephritid fruit flies. *Animal Behaviour*, 62(1), 33–40.
- Shikano**, I., & Isman, M. B. (2009). A sensitive period for larval gustatory learning influences subsequent oviposition choice by the cabbage looper moth. *Animal Behaviour*, 77(1), 247–251.
- Skoulakis**, E. M. C., & Davis, R. L. (1996). Olfactory Learning Deficits in Mutants for leonardo, a *Drosophila* Gene Encoding a 14-3-3 Protein. *Neuron*, 17(November), 931–944.
- Skoulakis**, E. M. C., Kalderon, D., & Davis, R. (1993). Preferential Expression in Mushroom Bodies of the Catalytic Subunit of Protein Kinase A and Its Role in learning and Memory. *Neuron*, 11(August), 197–208.
- Sluckin**, W. (1968). Imprinting in Guinea-pigs. *Nature*, 220(December), 1148.
- Smith**, F. V., & Bird, M. W. (1963). The correlation of responsiveness to visual and auditory stimuli in the domestic chick. *Animal Behaviour*, XII, 259–263.
- Smotherman**, W. P. (1982). Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiology and Behavior*, 29(5), 769–771.
- Snook**, R. R., & Karr, T. L. (1998). Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Current Biology*, 8(5), 291–294.
- Soller**, M., Bownes, M., & Kubli, E. (1997). Mating and sex peptide stimulate the accumulation of yolk in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*, 243(3), 732–738.
- Soo Ha**, T., & Smith, D. P. (2006). A Pheromone Receptor Mediates 11-cis-Vaccenyl Acetate- Induced Responses in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 26(34), 8727–8733.



- Sørensen**, P. W., & Scott, A. P. (1994). The evolution of hormonal sex pheromones in teleost fish: poor correlation between the pattern of steroid release by goldfish and olfactory sensitivity suggests that these cues evolved as a result of chemical spying rather than signal specialization. *Acta Physiologica Scandinavica*, 152(2), 191–205.
- Sorenson**, M. D., Sefc, K. M., & Payne, R. B. (2003). Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds. *Nature*, 424(August), 928–931.
- Stahnke**, L. H. (1999). Volatiles Produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during Growth in Sausage Minces Part I. Collection and Identification. *Lwt*, 32(6), 357–364.
- Stamps**, J. A., Yang, L. H., Morales, V. M., & Boundy-Mills, K. L. (2012). *Drosophila* regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate. *PLoS ONE*, 7(7), 11.
- Stefanini**, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*, 35(4), 315–330.
- Steiger**, S., Peschke, K., Francke, W., & Müller, J. (2007). The smell of parents: Breeding status influences cuticular hydrocarbon pattern in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1622), 2211–2220.
- Steinbrecht**, R. A., Laue, M., & Ziegelberger, G. (1995). Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell & Tissue Research*, 282(2), 203–217.
- Steinbrecht**, Rudolf Alexander. (1970). Zur morphometrie der antenne des seidenspinners, *Bombyx mori* L.: Zahl und Verteilung der Riechsensillen (Insecta, Lepidoptera). *Zeitschrift Für Morphologie Der Tiere*, 68(2), 93–126.
- Steinbrecht**, Rudolf Alexander. (1996). Structure and function of insect olfactory sensilla. *Novartis Foundation Symposium*, 158–183.
- Stern**, C. (1943). Genic action as studied by means of the effects of different doses and combinations of alleles. *Genetics*, 28(November), 441–474.
- Stocker**, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. 3–26.
- Stocker**, R. F., Tissot, M., & Gendre, N. (1995). Morphogenesis and cellular proliferation pattern in the developing antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol*, 205, 62–72.
- Stockinger**, P., Kvitsiani, D., Rotkopf, S., Tirián, L., & Dickson, B. J. (2005). Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. *Cell*, 121(5), 795–807.
- Stökl**, J., Strutz, A., Dafni, A., Svatos, A., Doubsky, J., Knaden, M., Sachse, S., Hansson, B., & Stensmyr, M. (2010). A deceptive pollination system targeting drosophilids through olfactory mimicry of yeast. *Current Biology*, 20(20), 1846–1852.
- Strataman**, R., & Markow, T. A. (1998). Resistance to thermal stress in desert *Drosophila*. *Functional Ecology*, 12(6), 965–970.

- Sun**, S., Zabinski, R. F., & Toney, M. D. (1998). Reactions of alternate substrates demonstrate stereoelectronic control of reactivity in dialkylglycine decarboxylase. *Biochemistry*, 37(11), 3865–3875.
- Sunesson**, A.-L., Nilsson, C.-A., Carlson, R., Blomquist, G., & Andersson, B. (1997). From Cultivated on Gypsum Board and Tryptone Agar-Influence of Temperature, Oxygen and Carbon Dioxide Production. *Ann. Occup. Hyg.*, 41(4), 393–413.
- Sunesson**, A.-L., Vaes, W. H. J., Nilsson, C. A., Blomquist, G., Andersson, B., & Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2911–2918.
- Sutter**, A., & Immler, S. (2020). Within-ejaculate sperm competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375, 7.
- Svetec**, N., & Ferveur, J. F. (2004). Social experience and pheromonal perception can change male-male interactions in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 208(5), 891–898.
- Symonds**, M. R. E., & Wertheim, B. (2005). The mode of evolution of aggregation pheromones in *Drosophila* species. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5), 1253–1263.
- Tan**, Y., Yu, D., Pletting, J., & Davis, R. L. (2010). Gilgamesh is required for rutabaga-independent olfactory learning in *Drosophila*. *Neuron*, 67(5), 810–820.
- Tanaka**, N. K., Awasaki, T., Shimada, T., & Ito, K. (2004). Integration of Chemosensory Pathways in the *Drosophila* Second-Order Olfactory Centers. *Current Biology*, 14(March), 449–457.
- Taylor**, C. E. (1988). Sexual selection in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 42(1), 197–199.
- Technau**, G., & Heisenberg, M. (1982). Neural reorganization during metamorphosis of the corpora pedunculata in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 295, 405–407.
- Teicher**, M. H., & Blass, E. (1976). Suckling in Newborn Rats: Eliminated by Nipple Lavage, Reinstated by Pup Saliva. *Science*, 193, 422–424.
- Thomas**, M., & Simmons, L. (2011). Crickets detect the genetic similarity of mating partners via cuticular hydrocarbons. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(8), 1793–1800.
- Thorpe**, W. H. (1939). Further studies on pre-imaginal olfactory conditioning in insects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 127(848), 424–433.
- Timko**, M. T., Yu, Z., Kroll, J., Jayne, J. T., Worsnop, D. R., Miake-Lye, R. C., Onasch, T. B., Liscinsky, D., Kirchstetter, T. W., Destailats, H., Holder, A. L., Smith, J. D., & Wilson, K. R. (2009). Sampling artifacts from conductive silicone tubing. *Aerosol Science and Technology*, 43(9), 855–865.
- Tissot**, M., Hawken, A., Sto, K. F., & Stocker, R. F. (1996). Larval Chemosensory Projections and Invasion of Adult Afferents in the Antennal Lobe of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 32, 281–297.

- Tissot**, M., & Stocker, R. F. (2000). Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: The fate of neurons throughout the stages. *Progress in Neurobiology*, 62(1), 89–111.
- Tram**, U., & Wolfner, M. F. (1999). Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Society of America*, 153(2), 837–844.
- Truman**, J. W., & Reiss, S. E. (1976). Dendritic reorganization of an identified motoneuron during metamorphosis of the tobacco hornworm moth. *Science*, 192(4238), 477–479.
- Tsuboi**, A., Yoshihara, S. I., Yamazaki, N., Kasai, H., Asai-Tsuboi, H., Komatsu, M., Serizawa, S., Ishii, T., Matsuda, Y., Nagawa, F., & Sakano, H. (1999). Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 19(19), 8409–8418.
- Tully**, T., Cambiazo, V., & Kruse, L. (1994a). Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 14(1), 68–74.
- Tully**, T., Preat, T., Boynton, S. C., & Del Vecchio, M. (1994b). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*, 79(1), 35–47.
- Tully**, Tim, & Quinn, W. G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*, 157(2), 263–277.
- van Breugel**, F., & Dickinson, M. H. (2014). Plume-tracking behavior of flying *Drosophila* emerges from a set of distinct sensory-motor reflexes. *Current Biology*, 24(3), 274–286.
- van der Goes van Naters**, W., & Carlson, J. R. (2007). Receptors and Neurons for Fly Odors in *Drosophila*. *Current Biology*, 17(7), 606–612.
- van Emden**, H. F., Sponagl, B., Wagner, E., Baker, T., Ganguly, S., & Douloupaka, S. (1996). Hopkins' "host selection principle", another nail in its coffin. *Physiological Entomology*, 21, 325–328.
- Vargas**, M. A., Luo, N., Yamaguchi, A., & Kapahi, P. (2010). A role for S6 kinase and serotonin in postmating dietary switch and balance of nutrients in *D. melanogaster*. *Current Biology*, 20(11), 1006–1011.
- Vergnais**, L., Masson, F., Montel, M. C., Berdagué, J. L., & Talon, R. (1998). Evaluation of Solid-Phase Microextraction for Analysis of Volatile Metabolites Produced by *Staphylococci*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 228–234.
- Verzijden**, M. N., & Cate, C. (2007). Early learning influences species assortative mating preferences in Lake Victoria cichlid fish. *Biology L*, 3(February), 134–136.
- Vijendravarma**, R. K., Narasimha, S., & Kawecki, T. J. (2013). Predatory cannibalism in *Drosophila melanogaster* larvae. *Nature Communications*, 4, 8.
- Vogt**, R. G., & Riddiford, L. M. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293, 161–163.

- Vogt**, R. G., & Riddiford, L. M. (1986). Scale esterase: A pheromone-degrading enzyme from scales of silk moth *Antheraea polyphemus*. *Journal of Chemical Ecology*, 12(9), 469–482.
- Vosshall**, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 505–533.
- Wadhams**, L. J., Blight, M. M., Kerguelen, V., Le Metayer, M., Marion-Poll, F., Masson, C., Pham-Delegue, M. H., & Woodcock, C. M. (1994). Discrimination of oilseed rape volatiles by Honey Bee: Novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay. *Journal of Chemical Ecology*, 20(12), 3221–3231.
- Wagh**, S. T., & Razvi, N. A. (2016). Marascuilo method of multiple comparisons (an analytical study of caesarean section delivery). *International Journal of Contemporary Medical Research*, 3(4), 1137–1140.
- Wang**, L., & Anderson, D. J. (2010). Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature*, 463(7278), 227–231.
- Wang**, L., Han, X., Mehren, J., Hiroi, M., Billeter, J. C., Miyamoto, T., Amrein, H., Levine, J. D., & Anderson, D. J. (2011). Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 14(6), 757–762.
- Weeks**, J. C., & Ernst-uttschneider, K. (1989). Respecification of Larval Proleg Motoneurons during Metamorphosis of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta*: Segmental Dependence and Hormonal Regulation. *Journal of Neurobiology*, 20(6), 569–592.
- Wehrenfennig**, C., Schott, M., Gasch, T., Düring, R. A., Vilcinskas, A., & Kohl, C. D. (2013). On-site airborne pheromone sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(20), 6389–6403.
- Wertheim**, B. (2001). Ecology of *Drosophila* aggregation pheromone: a multitrophic approach. In *Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*.
- Wertheim**, B., Allemand, R., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (2006). Effects of aggregation pheromone on individual behaviour and food web interactions: a field study on *Drosophila*. *Ecological Entomology*, 31(3), 216–226.
- Wertheim**, B., Dicke, M., & Vet, L. E. M. (2002). Behavioural plasticity in support of a benefit for aggregation pheromone use in *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103(1), 61–71.
- Wertheim**, B., Marchais, J., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (2002). Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: An interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms. *Ecological Entomology*, 27(5), 608–617.
- Wertheim**, B., Van Baalen, E. J., Dicke, M., & Vet, L. (2005). Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: An evolutionary ecological perspective. *Annual Review of Entomology*, 50(94), 321–346.
- Wertheim**, B., Vet, L. E. M., & Dicke, M. (2003). Increased risk of parasitism as ecological costs of using aggregation pheromones: Laboratory and field study of *Drosophila-Leptopilina* interaction. *Oikos*, 100(2), 269–282.

- White**, K., & Kankel, D. R. (1978). Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 65(2), 296–321.
- Wicher**, D., & GroBe-Wilde, E. (2017). Chemoreceptors in Evolution. In *Evolution of Nervous Systems* (Second Edi, Vol. 1). Elsevier.
- Wicher**, Dieter, Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., Wicher, D., Scha, R., & Hansson, B. S. (2008). *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(April), 1007–1012.
- Wicker-Thomas**, C., & Chertemps, T. (2010). Molecular biology and genetics of hydrocarbon production. In *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology* (Issue November 2017, pp. 53–74).
- Wilbur**, H. M. (1980). Complex life cycles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 11, 67–93.
- Wilkins**, K. (1996). Volatile metabolites from actinomycetes. *Chemosphere*, 32(7), 1427–1434.
- Wilson**, E O. (1988). *Biodiversity*.
- Wilson**, Edward O. (1975). Sociobiology : the abridged edition. In *New Scientist*.
- Wilson**, R. I., & Laurent, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *Journal of Neuroscience*, 25(40), 9069–9079.
- Wilson**, R. I., Turner, G. C., & Laurent, G. (2004). Transformation of Olfactory Representations in the *Drosophila* Antennal Lobe. *Science*, 303(5656), 366–370.
- Wolfner**, M. F. (2002). The gifts that keep on giving: Physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila*. *Heredity*, 88(2), 85–93.
- Wolfner**, Mariana F. (1997). Tokens of love: Functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(3), 179–192.
- Wright**, G. A. (2015). Olfaction: Smells like fly food. *Current Biology*, 25(4), R144–R146.
- Wyatt**, T. D. (2003). Pheromones and Animal Behaviour Communication by Smell and Taste.
- Wyatt**, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: Defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 196(10), 685–700.
- Xu**, P., Atkinson, R., Jones, D. N. M., & Smith, D. P. (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45(2), 193–200.
- Yang**, C., Liang, W., & Moller, A. P. (2018). Do cuckoos imprint on hosts , microhabitats , or nest sites ? Parasitism preferences in the common cuckoo (*Cuculus canorus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72(126), 5.
- Yang**, D. (2018). Carnivory in the larvae of *Drosophila melanogaster* and other *Drosophila* species. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.

- Yao**, C. A., Ignell, R., & Carlson, J. R. (2005). Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *Journal of Neuroscience*, 25(37), 8359–8367.
- Yew**, J., Dreisewerd, K., Luftmann, H., Müthing, J., Pohlentz, G., & Kravitz, E. (2009). A New Male Sex Pheromone and Novel Cuticular Cues for Chemical Communication in *Drosophila*. *Current Biology*, 19(15), 1245–1254.
- Yin**, J. C. P., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G., & Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 79(1), 49–58.
- Yu**, D., Akalal, D.-B., & Davis, R. L. (2006). *Drosophila* a/b mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron*, 52(5), 845–855.
- Yu**, D., Ponomarev, A., & Davis, R. L. (2004). Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning: Memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron*, 42(3), 437–449.
- Yusuyama**, K., Meinertzhagen, I. A., & Schürmann, F. W. (2002). Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 445(3), 211–226.
- Zawistowski**, S., & Richmond, R. C. (1985). Experience-mediated courtship reduction and competition for mates by male *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 15(6), 561–569.
- Zawistowski**, S., & Richmond, R. C. (1986). Inhibition of courtship and mating of *Drosophila melanogaster* by the male-produced lipid, cis-Vaccenyl Acetate. *Journal of Insect Physiology*, 32(3), 189–192.
- Zhao**, Z., & McBride, C. (2020). Evolution of olfactory circuits in insects. *Journal of Comparative Physiology A*, 206(3), 353–367.
- Ziegelberger**, G. (1995). Redox-Shift of the Pheromone-Binding Protein in the Silkworm *Antheraea Polyphemus*. *European Journal of Biochemistry*, 232(3), 706–711.
- Ziegelberger**, G. (1996). The multiple role of the pheromone-binding protein in olfactory transduction. *CIBA Foundation Symposia*, 200, 267–280.





**ANNEXES**





## Figures complémentaires

Tableau 4 [Annexe] Résultats des tests de Wilcoxon pour échantillons appariés sur les données de dépolarisations et repolarisations entre les réponses initiales et finales au 1-hexanol

	Sexes	CS		J1		J5		J5+cVA	
		V	<i>p</i>	V	<i>p</i>	V	<i>p</i>	V	<i>p</i>
<b>Dépolarisations</b>	Femelles	48	0,52	59	0,98	42	0,33	62	0,93
	Mâles	64	0,85	90	0,09	76	0,389	67	0,72
<b>Repolarisations</b>	Femelles	56	0,847	79	0,389	62	0,934	92	0,073
	Mâles	69	0,639	81	0,252	56	0,855	91	0,08

Tableau 5 [Annexe] Résultats des analyses des espaces de tête d'environnements avec ou sans nourritures manipulés par des Drosophiles et en présence ou non de cVA

temps	Identification	Témoïn vide	Nourriture	Male <i>melanogaster</i>	Femelle <i>melanogaster</i>	Male <i>melanogaster</i> + nourriture	Femelle <i>melanogaster</i> + nourriture
2,66	Acide pyruvique						1067499 < 1086973
11,14	Acétyldrazide					348412 < 487414	
24,1	Acide acétique	563209 < 3313210	474778 < 1745392	3318160 < 8467917	3130463 < 5556286	4165202 < 802929218	518342 < 209818016
27,108	Acide propanoïque						
28	Acide isobutyrique					2035209 < 2994789	
31	Acide isovalérique					1473486 < 1897543	
35,94	Acide hexanoïque					302752 < 3602271	
36,22	Acide heptanoïque						
41,56	Acide octanoïque					1854673 < 5186013	1129742 < 9875815
46,4	Acide decanoïque		3351728 < 11607113				2864759 < 14950873
1,8	Ethanol					850267 < 3261509	
4,4	2-méthyl butanal						
4,49	3-méthyl butanal		989639 < 1402906				695998 < 1409222
6,42	Butanal	203193 < 205622					
8,2	Pentanal						
10,2	Hexanal	487809 < 2546433	2019324 < 4494583			1134287 < 1947985	1018549 < 2832786
14,26	Heptanal		1066021 < 14933390	442844 < 880358			769213 < 892028
14,83	2-Butenal, 3-méthyl-						437538 < 555496
18,2	Octanal	320424 < 1266895	559600 < 1102983		330556 < 6548994		238970 < 1125545
21,9	Nonanal	752921 < 2419775	573335 < 2510703	444084 < 2934297	475908 < 920784	1027021 < 1569568	1110985 < 2251216
25,16	Dodecanal						
25,36	Decanal	828458 < 1740122	1156835 < 2348786	952576 < 1104475	470508 < 1345942	680307 < 1338776	1227256 < 3306332
26,2	Benzaldehyde	225012 < 736687	699653 < 1683069			631930 < 1868377	533378 < 792631
28,6	Undecanal						
31,8	2-hexenal						
2,7	Acétone			1767230 < 1901439	2328132 < 5791938	684947 < 1434673	
4,1	2-butanone				572794 < 1813546		
6,4	3-méthylbutan-2-one			1112313 < 1279969			
7,36	2-pentanone,4-méthyl						
7,38	2-pentanone,3-méthyl						
18	Acétoïne	371228 < 670428		510930 < 17227137	532114 < 4990117	5001730 < 11478119	
20	6-méthyl,5-hepten-2-one		596112 < 1585908			1037368 < 2069695	683404 < 935802
20,89	3-méthyl,3-buten-2-one						
5,3	Ethanol	1751221 < 137599340	460131067 < 585773643	699252 < 122462706	37745001 < 183123441	405342889 < 440180148	482849477 < 608139536
12,93	Butanol	259473 < 1473772					
15,4	3-méthyl butanol						
16	Pentanol						
20,25	2-Propanol						285264 < 1323989
20,59	Hexanol					499980 < 883870	400742 < 515278
20,6	2-méthyl-3-buten-2-ol		1435858 < 2177238			961469 < 1166711	
20,615	4-méthylpentanol					1874904 < 3663275	2163634 < 3231613
24,42	1,3-butanediol						
25,16	2-méthyl butanol						
26,31	2,3-butanediol						
26,769	2-hexanol						
26,8	2-butanol, 3-méthyl						
27,91	2-pentanol						
28,66	Heptanol						
30,368	Octanol						
30,4	Nonanol	266835 < 2064105					
36,39	Benzenemethanol						
37,4	2-Phényl ethanol			1720700 < 5252992		1585932 < 4399461	1358081 < 7375326
3,8	Ethyl acetate	885547 < 5996734	1672456 < 2195918		314241 < 1648752	13106749 < 123528052	2472152 < 45375543
7,68	Isobutyl acetate		694079 < 888938				
8,6	Ethyl butyrate					450962 < 862454	
11,8	Isoamyl acetate		946704 < 1206816				
13,25	Isobutyl butanoate		695908 < 1015297				
16,16	Ethyl hexanoate					280490 < 580206	
17,3	Acide butyrique		426342 < 1068861				
19,4	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, 1,2-diméthyl ester				104047 < 231012		
23,27	Ethyl octanoate		392029 < 1358463			5157526 < 10767559	1516763 < 2421145
26,52	Pentanoic acid, ethyl ester						
29,6	Ethyl caprate						
31,21	Ethyl 9-decenoate					13294878 < 29072377	3244619 < 6868916
35,4	Ethyl laurate		2673251 < 5297742			1401440 < 3409545	581296 < 1235501
35,87	Isoamyl decanoate		642651 < 2335876			1355001 < 2745660	929543 < 6086288
40,26	Benzoic acid, 3-hydroxy méthyl ester						
40,35	Benzoic acid, 2-hydroxy, hydrazide ou méthyl ester						
41,9	Benzoic acid 2-methoxy- méthyl ester						
41,95	Méthyl anisate		3923067 < 1223352			1397023 < 3341547	1088497 < 6234989
42	Butanoic acid, 3-hydroxy,ethyl ester						
8,56	Méthylbenzène						
9,6	Ethene,ethoxy						
9,85	Disulfide diméthyl						
14,24	1-Aziridineethanamine			40018322 < 40036175			
16,1	2-pentyl-furan		532223 < 876308			250625 < 675188	333697 < 590092
17	styrene		1454260 < 1496501				
17,8	Benzoyl bromide			545786 < 706214	577526 < 908208		
20,181	Ethanol,2-butoxy-						
22,7	4-nonyne						
22,76	5-Ethylcyclopent-1-ene-carboxaldehyde		499618 < 752229				642617 < 857010
25,35	11-tetradecen-1-ol acetate						
26,27	Acetamide						
28,5	2(5H)-Furanone;5,5-diméthyl		489816 < 1714203			627216 < 2251805	565435 < 848337
28,5	b-Caryophyllène						
29,97	Méthyl-d3 1-Dideuterio-2-propenyl Ether						
30,65	α-Caryophyllène					659365 < 1350386	
30,68	Humulène		248597 < 593100				
33,1	Oxime; methoxy-phenyl-_-	592974 < 2045453		646990 < 8146923	921036 < 5602330	2102484 < 19011715	2709716 < 6645343
33,15	benzaldehyde,4-methoxy-,oxime-						
35,76	Geranyl acetone						
40,559	Méthylparabène			7037054 < 69731150	6793150 < 15651228		
41,26	Triacétin						
57,327	Hexane,3-methoxy-						
57,35	Ether sec-butyl isopropyl						
10,25	2-butanamine						
10,5	Methanamine, N-méthyl						
38,86	1-butanamine,3-méthyl						
1,6	Hexane						
3,9	Octane						

# Annexes

temps	Identification	Male simulans	Femelle simulans	Male simulans + nourriture	Femelle simulans + nourriture	cVA	cVA + nourriture	c VA liquide
2,56	Acide pyruvique							
11,14	Acetylglaxide							
24,1	Acide acetique	3338061 < 4462815	304198 < 3966257	1215846 < 13890404	328186 < 4648072	1707770 < 2010851	2195146 < 3328636	
27,108	Acide propanoique	286802 < 377905	185856 < 360717	403270 < 627213	207912 < 285287			
28	Acide isobutyrique							
31	Acide isovalerique							
35,94	Acide hexanoique			426528 < 822454	442839 < 824460		3408617 < 5730103	
36,22	Acide heptanoique			1555690 < 2115703	2168954 < 2943321		4011040 < 6378022	
41,56	Acide octanoique			4406418 < 4713701	2463056 < 8268661			
46,4	Acide decanoique		158134 < 3394274					
1,8	Ethanol							
4,4	2-methyl butanal						952628 < 379295	
4,49	3-methyl butanal						1553164 < 3702994	
6,42	Butanal	800144 < 935446	253442 < 308488	449407 < 567824	462301 < 601067			
8,2	Pentanal		402455 < 1464740		145261 < 272237			
10,2	Hexanal			1558852 < 2363642	1148912 < 1835391		5053527 < 6354306	
14,26	Heptanal	1276227 < 1055327	73720 < 706583	650080 < 765325	860816 < 1006641	865850 < 902644		
14,83	2-Butenal, 3-methyl-			299926 < 401497				
18,2	Octanal	354504 < 537503	435474 < 558724	754031 < 889587	552212 < 1716846	1442502 < 1671777	1534986 < 1802561	
21,9	Nonanal	1135575 < 1326462	82630 < 1243334	1220536 < 1892971	1328634 < 3867202	2626353 < 3839504	82115 < 2660242	
25,16	Dodecanal		271961 < 295774		269390 < 269794			
25,36	Decanal	1512013 < 2119560	110217 < 2135705	1322524 < 2783466	1700241 < 7733200		2908032 < 4004313	
26,2	Benzaldehyde			521351 < 553637	507575 < 563138		1227013 < 1429388	
28,6	Undecanal				425129 < 591527			
31,8	2-hexenal			240898 < 339303				
2,7	Acetone	367432 < 614441		538385 < 649781	510867 < 853770			
4,1	2-butanone							
6,4	3-methylbutan-2-one							
7,36	2-pentanone,4-methyl				207412 < 277214			
7,38	2-pentanone,3-methyl						1097036 < 1121641	
18	Acetoine	291344 < 330449						
20	6-methyl,5-hepten-2-one	242080 < 244805	177539 < 373985	616265 < 889210	589101 < 1212860	1724769 < 2408570	2575471 < 2885173	
20,89	3-methyl,3-buten-2-one		278957 < 378565					
5,3	Ethanol	521650 < 1592064	186757 < 985984	307789915 < 335161229	151783646 < 334534502	13686061 < 48666394	539748443 < 797022393	9311870581
12,93	Butanol							
15,4	3-methyl butanol	232437 < 256050		228702 < 258073	192267 < 308096		542136 < 825689	
16	Pentanol			178814 < 478267	390766 < 799095			
20,25	2-Propanol							
20,59	Hexanol						577652 < 738812	
20,6	2-methyl,3-buten-2-ol			1271425 < 1287337	1182999 < 1364389		1614044 < 3888103	
20,615	4-methylpentanol				193973 < 347948			
24,42	1,3-butanediol			698956 < 1016914				
25,16	2-methyl butanol		287557 < 310028					
26,31	2,3-butanediol	221885 < 314565	214106 < 656973					
26,769	2-hexanol				375372 < 534744			
26,8	2-butanol, 3-methyl							
27,91	2-pentanol	346115 < 348793			397415 < 4033604			
28,66	Heptanol	303835 < 370205			102386 < 233116			
30,368	Octanol	358559 < 560254	447773 < 499454					
30,4	Nonanol			596751 < 628526	511008 < 723323			
36,39	Benzenemethanol					887199 < 1102909		
37,4	2-Phenylethanol			2067148 < 2918753	1532131 < 2156147		4095649 < 5107377	
3,8	Ethyl acetate			11579910 < 15968781	990933 < 4527408			
7,68	Isobutyl acetate							
8,6	Ethyl butyrate							
11,8	Isoamyl acetate							
13,25	Isobutyl butanoate							
16,16	Ethyl hexanoate							
17,3	Acide butyrique							
19,4	1,2,4-Benzenetri-carboxylic acid, 1,2-dimethyl ester			2562683 < 4264450	564481 < 1642017		1606278 < 2096091	
23,27	Ethyl octanoate			192285 < 238071				
26,52	Pentanoic acid, ethyl ester			10455919 < 14566076	8673192 < 9609663			
29,6	Ethyl caprate			1046744 < 1657226	583893 < 890094			
31,21	Ethyl 9-decenoate			1747400 < 2604470	1212598 < 2555673		4627008 < 5566773	
35,4	Ethyl laurate							
35,87	Isoamyl decanoate							
40,26	Benzoic acid, 3-hydroxy methyl ester						6890875 < 9808818	
40,35	Benzoic acid, 2-hydroxy, hydrazide ou methyl ester			13450330 < 19440801				
41,9	Benzoic acid 2-methoxy- methyl ester			1284153 < 1622839				
41,95	Methyl anisate	2062750 < 4724308			803735 < 14016041		1961274 < 4011040	
42	Butanoic acid, 3-hydroxy,ethyl ester		772589 < 1489110	704019 < 734943				
8,56	Methylbenzene	274682 < 461704		659322 < 830726	469106 < 804876			
9,6	Ethene,ethoxy		163274 < 803604					
9,85	Disulfide dimethyl			679820 < 711359	471223 < 865094		2943125 < 3426299	
14,24	1-Aziridineethanamine							
16,1	2-pentyl-furan			214066 < 276059	134315 < 372072		1496195 < 2830126	
17	Styrene			613518 < 719772	257515 < 668834			
17,8	Benzoyl bromide							
20,181	Ethanol,2-butoxy-		345262 < 474851					
22,7	4-nonyne						1199450 < 1384283	
22,76	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde							
25,35	11-tetradecen-1-ol acetate					3109760 < 3784907		
26,27	Acetamide	158797 < 266892						
28,5	2(5H)-Furanone, 3,5-dimethyl				588165 < 701940		1273999 < 1706766	
28,5	b-Caryophyllene				308683 < 377993			
29,97	Methyl-d3 1-Diduterio-2-propenyl Ether	2462225 < 3195207	906657 < 1971488	3792674 < 4126599		5041963 < 5305224	5634989 < 6469034	
30,65	α-Caryophyllene							
30,68	Humulene			800196 < 829185	518760 < 707870		1854849 < 2968187	
33,1	Oxime-, methoxy-phenyl-							
33,15	benzaldehyde,4-methoxy-,oxime-		191727 < 619114					
35,76	Geranyl acetone			783639 < 830516		800118 < 2013093	3082229 < 3556731	
40,559	Methylparaben							
41,26	Triacetin	578374 < 1022950						
57,327	Hexane,3-methoxy-	305588 < 1731039						
57,35	Ether sec-butyl isopropyl	4120253 < 5490502	743044 < 34339718					
10,25	2-butanamine			192258 < 218897				
10,5	Methanamine, N-methyl				1240286 < 1324909			
38,86	1-butanamine,3-methyl	511794 < 583073						
1,6	Hexane					33797573 < 138684484	10275332 < 164550916	
3,9	Octane	457332 < 2654157						

temps	Identification	Sources possibles
2,66	Acide pyruvique	
11,14	Acéthylaziridine	
24,1	Acide acétique	[levures] (Becher et al., 2012) [bactéries] (Beck et al., 2002), (Robacker et al., 1998)
27,108	Acide propanoïque	[bactéries] (Beck et al., 2002)
28	Acide isobutyrique	[bactéries] (Beck et al., 2002), (Robacker et al., 1998)
31	Acide isovalérique	[bactéries] (Beck et al., 2002), (Robacker et al., 1998)
35,94	Acide hexanoïque	[levures] (Farine et al., 2014) [bactéries] (Kiviranta et al., 1998)
36,22	Acide heptanoïque	
41,56	Acide octanoïque	[levures] (Farine et al., 2014), (Palanca et al., 2013)
46,4	Acide decanoïque	[levures] (Farine et al., 2014), (Palanca et al., 2013)
1,8	Ethanal	[bactéries] (Ryu et al., 2004)
4,4	2-méthyl butanal	[bactéries] (Beck et al., 2002), (De Vos Petersen et al., 2004)
4,49	3-méthyl butanal	[bactéries] (Beck et al., 2002), (De Vos Petersen et al., 2004)
6,42	Butanal	
8,2	Pentanal	
10,2	Hexanal	[levures] (Palanca et al., 2013)
14,26	Heptanal	[drosophilés] (Lebreton et al., 2017)
14,83	2-Butenal, 3-méthyl-	[bactéries] (Beck et al., 2002), (Dickschat et al., 2005b)
18,2	Octanal	[drosophilés] (Lebreton et al., 2017) [bactéries] (Sunesson et al., 1995)
21,9	Nonanal	[drosophilés] (Lebreton et al., 2017) [levures] (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Schulz et al., 2004)
25,16	Dodecanal	
25,36	Decanal	[bactéries] (Höckelmann et al., 2004), (Bruce et al., 2004)
26,2	Benzaldehyde	[bactéries] (Beck et al., 2002), (Dickschat et al., 2005a)
28,6	Undecanal	[drosophilés] (Lebreton et al., 2017)
31,8	2-hexenal	[levures] (Palanca et al., 2013)
2,7	Acétone	[bactéries] (Beck et al., 2002), (De Vos Petersen et al., 2004)
4,1	2-butanone	[bactéries] (Beck et al., 2002), (De Vos Petersen et al., 2004), (Höckelmann & Jüttner, 2004)
6,4	3-méthylbutan-2-one	[bactéries] (Wilkins, 1996), (Sunesson et al., 1997)
7,36	2-pentanone,4-méthyl	[bactéries] (Wilkins, 1996), (Sunesson et al., 1997)
7,38	2-pentanone,3-méthyl	[bactéries] (Wilkins, 1996), (Sunesson et al., 1997)
18	Acétoïne	[levures] (Becher et al., 2012), (Farine et al., 2014), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Beck et al., 2002), (Kiviranta et al., 1998)
20	6-méthyl,5-hepten-2-one	[bactéries] (Dickschat et al., 2005b), (Höckelmann & Jüttner, 2004)
20,89	3-méthyl,3-buten-2-one	
5,3	Ethanol	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013)
12,93	Butanol	[levures] (Becher et al., 2012) [bactéries] (Kiviranta et al., 1998)
15,4	3-méthyl butanol	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Beck et al., 2002), (Kiviranta et al., 1998)
16	Pentanol	[bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Höckelmann et al., 2004)
20,25	2-Propanol	
20,59	Hexanol	[bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Höckelmann & Jüttner, 2004)
20,6	2-méthyl-3-buten-2-ol	[bactéries] (Schöller et al., 2002)
20,615	4-méthylpentanol	
24,42	1,3-butanediol	
25,16	2-méthyl butanol	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Beck et al., 2002), (Kiviranta et al., 1998)
26,31	2,3-butanediol	[levures] (Becher et al., 2012), (Farine et al., 2014) [bactéries] (Pollak & Berger, 1996)
26,769	2-hexanol	
26,8	2-butanol, 3-méthyl	[bactéries] (Beck et al., 2002), (Dickschat et al., 2005b)
27,91	2-pentanol	[bactéries] (Pollak & Berger, 1996)
28,66	Heptanol	[bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Höckelmann & Jüttner, 2004)
30,368	Octanol	[bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Höckelmann et al., 2004)
30,4	Nonanol	
36,39	Benzénemethanol	
37,4	2-Phényléthanol	[levures] (Becher et al., 2012), (Farine et al., 2014), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Bruce et al., 2004)
3,8	Ethyl acetate	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Kiviranta et al., 1998), (Bruce et al., 2004)
7,68	Isobutyl acetate	[bactéries] (Dickschat et al., 2005b), (Kiviranta et al., 1998)
8,6	Ethyl butyrate	[levures] (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Kiviranta et al., 1998)
11,8	Isoamyl acetate	[bactéries] (Dickschat et al., 2005c)
13,25	Isobutyl butanoate	
16,16	Ethyl hexanoate	
17,3	Acide butyrique	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013)
19,4	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, 1,2-dimethyl ester	
23,27	Ethyl octanoate	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Schulz & Dickschat, 2007)
26,52	Pentanoic acid, ethyl ester	
29,6	Ethyl caprate	[levures] (Becher et al., 2012), (Palanca et al., 2013)
31,21	Ethyl 9-decenoate	[levures] (Palanca et al., 2013)
35,4	Ethyl laurate	[levures] (Palanca et al., 2013)
35,87	Isoamyl decanoate	
40,26	Benzoic acid, 3-hydroxy methyl ester	[bactéries] (Schöller et al., 2002)
40,35	Benzoic acid, 2-hydroxy, hydrazide ou methyl ester	
41,9	Benzoic acid 2-methoxy- methyl ester	[bactéries] (Schulz et al., 2004), (Schöller et al., 2002)
41,95	Methyl anisate	[bactéries] (Schulz et al., 2004)
42	Butanoic acid, 3-hydroxy,ethyl ester	
8,56	Methylbenzene	
9,6	Ethene,ethoxy	
9,85	Disulfide dimethyl	[bactéries] (Schulz & Dickschat, 2007)
14,24	1-Aziridineethanamine	
16,1	2-pentyl-furan	
17	Styrene	[levures] (Palanca et al., 2013) [bactéries] (Schulz & Dickschat, 2007)
17,8	Benzoyl bromide	
20,181	Ethanol,2-butoxy-	
22,7	4-nonyne	
22,76	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	
25,35	11-tetradecen-1-ol acetate	
26,27	Acetamide	[bactéries] (Dickschat et al., 2005c)
28,5	2(SH)-Furanone; 5,5-dimethyl	
28,5	b-Caryophyllène	[bactéries] (Dickschat et al., 2005a)
29,97	Methyl-d3 1-Dideuterio-2-propenyl Ether	
30,65	α-Caryophyllène	
30,68	Humulène	[bactéries] (Schulz & Dickschat, 2007)
33,1	Oxime-, methoxy-phenyl-	
33,15	benzaldehyde,4-methoxy-,oxime-	
35,76	Geranyl acetone	[bactéries] (Dickschat et al., 2005b)
40,559	Methylparaben	
41,26	Triacetin	
57,327	Hexane,3-methoxy-	
57,35	Ether sec-butyl isopropyl	
10,25	2-butanamine	
10,5	Methanamine, N-methyl	
38,86	1-butanamine,3-méthyl	
1,6	Hexane	
3,9	Octane	



temps	Identification	Voies de biosynthèse / Précurseurs
2,66	Acide pyruvique	<b>Pyruvate</b> (Gottschalk, 1986)
11,14	Acéthylazide	
24,1	Acide acétique	<b>Pyruvate</b> (Kandler, 1983)
27,108	Acide propanoïque	<b>Pyruvate</b> (Gottschalk, 1986)
28	Acide isobutyrique	<b>Val</b> (Dickinson et al., 1998)
31	Acide isovalérique	<b>Leu</b> (Vergnais et al., 1998)
35,94	Acide hexanoïque	
36,22	Acide heptanoïque	
41,56	Acide octanoïque	
46,4	Acide decanoïque	
1,8	Ethanal	<b>Pyruvate</b> (Kandler, 1983)
4,4	2-méthyl butanal	<b>Ile</b> (Engels et al., 2000)
4,49	3-méthyl butanal	<b>Leu</b> (Møller et al., 1998), (Vergnais et al., 1998)
6,42	Butanal	
8,2	Pentanal	
10,2	Hexanal	
14,26	Heptanal	
14,83	2-Butenal, 3-méthyl-	
18,2	Octanal	<b>Voie des acides gras</b> (Höckelmann et al., 2004)
21,9	Nonanal	<b>Voie des acides gras</b> (Höckelmann et al., 2004)
25,16	Dodecanal	
25,36	Decanal	<b>Voie des acides gras</b> (Höckelmann et al., 2004)
26,2	Benzaldehyde	<b>Phe</b> (Nierop Groot & De Bont, 1998), (Krings et al., 1996), (Lapadatescu et al., 2000)
28,6	Undecanal	
31,8	2-hexenal	
2,7	Acétone	<b>Pyruvate</b> (Gottschalk, 1986)
4,1	2-butanone	<b>Pyruvate</b> (Sun et al., 1998)
6,4	3-méthylbutan-2-one	<b>Leu</b> (Stahnke, 1999)
7,36	2-pentanone,4-méthyl	<b>Leu</b> (Stahnke, 1999)
7,38	2-pentanone,3-méthyl	
18	Acétoïne	<b>Pyruvate</b> (Rizzi, 1988), (Sun et al., 1998)
20	6-méthyl,5-hepten-2-one	<b>Voie des isoprénoides</b> (Höckelmann & Jüttner, 2004)
20,89	3-méthyl,3-buten-2-one	
5,3	Ethanol	<b>Pyruvate</b> (Kandler, 1983)
12,93	Butanol	
15,4	3-méthyl butanol	<b>Leu</b> (Møller et al., 1998), (Vergnais et al., 1998)
16	Pentanol	
20,25	2-Propanol	<b>Pyruvate</b> (Gottschalk, 1986)
20,59	Hexanol	<b>Voie des acides gras</b> (Höckelmann & Jüttner, 2004)
20,6	2-méthyl-3-buten-2-ol	<b>Leu</b> (Stahnke, 1999)
20,615	4-méthylpentanol	
24,42	1,3-butanediol	
25,16	2-méthyl butanol	<b>Ile</b> (Dickinson et al., 2000)
26,31	2,3-butanediol	<b>Pyruvate</b> (Amarita et al., 2001)
26,769	2-hexanol	
26,8	2-butanol, 3-méthyl	<b>Leu</b> (Stahnke, 1999)
27,91	2-pentanol	
28,66	Heptanol	<b>Voie des acides gras</b> (Höckelmann & Jüttner, 2004)
30,368	Octanol	
30,4	Nonanol	
36,39	Benzenemethanol	
37,4	2-Phényléthanol	<b>Phe</b> (Krings et al., 1996), (Lapadatescu et al., 2000)
3,8	Ethyl acetate	
7,68	Isobutyl acetate	
8,6	Ethyl butyrate	
11,8	Isoamyl acetate	
13,25	Isobutyl butanoate	
16,16	Ethyl hexanoate	
17,3	Acide butyrique	
19,4	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, 1,2-diméthyl ester	
23,27	Ethyl octanoate	
26,52	Pentanoic acid, ethyl ester	
29,6	Ethyl caprate	
31,21	Ethyl 9-decenoate	
35,4	Ethyl laurate	
35,87	Isoamyl decanoate	
40,26	Benzoic acid, 3-hydroxy méthyl ester	
40,35	Benzoic acid, 2-hydroxy, hydrazide ou méthyl ester	
41,9	Benzoic acid 2-méthoxy- méthyl ester	<b>Voie de Shikimate</b> (Schulz & Dickschat, 2007)
41,95	Méthyl anisate	<b>Voie de Shikimate</b> (Schulz & Dickschat, 2007)
42	Butanoic acid, 3-hydroxy,ethyl ester	
8,56	Méthylbenzene	
9,6	Ethene,ethoxy	
9,85	Disulfide diméthyl	<b>Met</b> (Engels et al., 2000)
14,24	1-Aziridineethanamine	
16,1	2-pentyl-furan	
17	Styrene	
17,8	Benzoyl bromide	
20,181	Ethanol,2-butoxy-	
22,7	4-nonyne	
22,76	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	
25,35	11-tetradecen-1-ol acetate	
26,27	Acetamide	
28,5	2(5H)-Furanone; 5,5-diméthyl	
28,5	b-Caryophyllène	
29,97	Méthyl-d3 1-Dideutério-2-propenyl Ether	
30,65	α-Caryophyllène	
30,68	Humulène	
33,1	Oxime-, méthoxy-phenyl-	
33,15	benzaldehyde,4-méthoxy-,oxime-	
35,76	Geranyl acetone	
40,559	Méthylparaben	
41,26	Triacétin	
57,327	Hexane,3-méthoxy-	
57,35	Ether sec-butyl isopropyl	
10,25	2-butanamine	
10,5	Methanamine, N-méthyl	
38,86	1-butanamine,3-méthyl	
1,6	Hexane	
3,9	Octane	

temps	Identification	Sans Nourriture		Avec Nourriture / global	
		melano.	simulans	melano.	simulans
2,66	Acide pyruvique			M c	
11,14	Acétylhydrazide			M	
24,1	Acide acétique				F c
27,108	Acide propanoïque		MF		
28	Acide isobutyrique			M c	
31	Acide isovalérique			M c	
35,94	Acide hexanoïque			M c	
36,22	Acide heptanoïque				F
41,56	Acide octanoïque				
46,4	Acide decanoïque				
1,8	Ethanal			M c	
4,4	2-méthyl butanal				
4,49	3-méthyl butanal				
6,42	Butanal		M		F c
8,2	Pentanal		F c		F c
10,2	Hexanal				
14,26	Heptanal		M		
14,83	2-Butanal, 3-méthyl-				
18,2	Octanal				F
21,9	Nonanal				F
25,16	Dodecanal		F c		F c
25,36	Decanal		MF		F
26,2	Benzaldéhyde				
28,6	Undecanal				F c
31,8	2-hexenal				
2,7	Acétone	MF			
4,1	2-butanone				
6,4	3-méthylbutan-2-one				
7,36	2-pentanone,4-méthyl				F c
7,38	2-pentanone,3-méthyl				
18	Acétoïne	MF		M (c)	
20	6-méthyl,5-hepten-2-one		MF	M	
20,89	3-méthyl,3-buten-2-one		F c		
5,3	Ethanol	MF			
12,93	Butanol				F
15,4	3-méthylbutanol		M c		
16	Pentanol			M	
20,25	2-Propanol			M c	
20,59	Hexanol				
20,6	2-méthyl-3-buten-2-ol				
20,615	4-méthylpentanol				F c
24,42	1,3-butanediol				
25,16	2-méthylbutanol		F c		F c
26,31	2,3-butanediol		F		
26,769	2-hexanol				F c
26,8	2-butanol, 3-méthyl				
27,91	2-pentanol		M c		F (c)
28,66	Heptanol		M c		F c
30,368	Octanol		MF		
30,4	Nonanol				F
36,39	Benzeneméthanol				
37,4	2-Phényléthanol				
3,8	Ethyl acetate	MF		M	
7,68	Isobutyl acetate				
8,6	Ethyl butyrate			M c	
11,8	Isoamyl acetate				
13,25	Isobutyl butanoate				
16,16	Ethyl hexanoate			M c	
17,3	Acide butyrique				
19,4	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, 1,2-diméthyl ester				
23,27	Ethyl octanoate			M	
26,52	Pentanoic acid, ethyl ester				
29,6	Ethyl caprate			M	
31,21	Ethyl 9-decenoate			M	
35,4	Ethyl laurate				
35,87	Isoamyl decanoate				
40,26	Benzoic acid, 3-hydroxy méthyl ester				
40,35	Benzoic acid, 2-hydroxy, hydrazide ou méthyl ester				
41,9	Benzoic acid 2-methoxy- méthyl ester				
41,95	Méthyl anisate		M c		
42	Butanoic acid, 3-hydroxy,ethyl ester		F c		
8,56	Méthylbenzène		M c		F
9,6	Ethene,ethoxy		F c		F c
9,85	Disulfide diméthyl				F
14,24	1-Aziridineethanamine				
16,1	2-pentyl-furan				
17	Styrene				
17,8	Benzoyl bromide	MF			
20,181	Ethanol,2-butoxy-4-nonyne		F c		F c
22,7					
22,76	5-Ethylcyclopent-1-ene-carboxaldehyde				
25,35	11-tétradécen-1-ol acetate				
26,27	Acétamide		M c		
28,5	2(5H)-Furanone; 5,5-diméthyl			M	
28,5	b-Caryophyllène				
29,97	Méthyl-d3 1-Didéutério-2-propényl Ether		MF		
30,65	α-Caryophyllène			M c	
30,68	Humulène				F
33,1	Oxime-, méthoxy-phenyl-_	MF		M	
33,15	benzaldehyde,4-méthoxy-,oxime-		F c		
35,76	Geranyl acetone				
40,559	Méthylparaben	MF			
41,26	Triacétin		M c		
57,327	Hexane,3-méthoxy-		M c		
57,35	Ether sec-butyl isopropyl		F		
10,25	2-butanamine		F c		F c
10,5	Methanamine, N-méthyl				F c
38,86	1-butanamine,3-méthyl		M c		
1,6	Hexane				
3,9	Octane		M c		

## **Publications et Communications**

### **Publications**

[Soumis] *Drosophila* free-flight odour tracking is altered in a sex-specific manner by pre imaginal sensory exposure. **Tolassy V.**, Cazalé-Debat, L., Houot, B., Reynaud R., Heydel, JM., Ferveur JF., Everaerts C. (2022) *Journal of Chemical Ecology*.

### **Communication affichée**

[1] Pheromonal imprinting in *Drosophila melanogaster*: preadult exposure affects free flight odor tracking in adult. **Tolassy V.**, Everaerts C., Ferveur JF. (2021) 3rd international student course in behavioral biology, à distance.

### **Communications orales**

[1] Impact d'une imprégnation phéromonale sur le développement neuronal et comportemental d'adultes *Drosophila melanogaster*. **Tolassy V.**, Everaerts C., Ferveur JF. (2021) 7èmes journées scientifiques MediatEC, Toulouse.

[2] Pheromonal « Proust's madeleine » in *Drosophila melanogaster*: cVA imprinting impact on adult neural and behavioral development. **Tolassy V.**, Everaerts C., Ferveur JF. (2022) Forum des Jeunes Chercheurs de l'ED ES, Dijon.

### **Activités de vulgarisation**

- Animation de stand lors de *La nuit des chercheurs*, 2021, Dijon.
- Animation de stand lors de l'inauguration de *La Cité Internationale de la Gastronomie et du Vin*, 2022, Dijon.
- Animation de stand lors de Speed Searching organisés par *La Mission Culture Scientifique* de la faculté de Bourgogne, 2020, 2021, 2022, Dijon et alentours.

### **Enseignements**

128 heures de service - Travaux Dirigés et Pratiques de l'UE Biodiversité et Histoire Naturelle - Licences 1 et 2 Biologie des Organismes, Faculté de Bourgogne.



# DROSOPHILA FREE-FLIGHT ODOUR TRACKING IS ALTERED IN A SEX-SPECIFIC MANNER BY PREIMAGINAL SENSORY EXPOSURE.

TOLASSY Vincent<sup>1</sup>

CAZALÉ-DEBAT Laurie<sup>1, 2</sup> (Orcid ID: 0000-0001-7051-4064)

HOUOT Benjamin<sup>1, 2</sup> (Orcid ID: 0000-0002-1966-2608)

REYNAUD Rémy<sup>1</sup>

HEYDEL Jean-Marie<sup>1</sup> (Orcid ID: 0000-0002-6089-9992)

FERVEUR Jean-François<sup>1</sup> (Orcid ID: 0000-0002-4022-686X)

EVERAERTS Claude<sup>1,\*</sup> (Orcid ID: 0000-0002-7559-083X)

<sup>1</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR6265 CNRS, UMR1324 INRA,  
Université de Bourgogne Franche-Comté, 6, Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup> Present address: School of Biosciences, University of Birmingham, Edgbaston Park  
Road, Birmingham B15 2TT, UK.

<sup>3</sup> Present address: Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard-Vaillant 94805 Villejuif  
Cedex France

\* Corresponding author: [claud.everaerts@u-bourgogne.fr](mailto:claud.everaerts@u-bourgogne.fr)

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jérôme Cortot for technical help.

## FUNDING

This work was funded by the University of Bourgogne-Franche Comté, the Bourgogne-Franche Comté Regional Council (PARI 2016), the “Fonds Européen de Développement Régional” (FEDER), and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS; Insb).

## CONFLICTS OF INTEREST/COMPETING INTERESTS

The authors have no conflict of interest or competing interest to declare.

## DATA AVAILABILITY

All data will be made available as supplementary material upon publication

**Abstract** - In insects such as *Drosophila melanogaster*, flight guidance is based upon converging sensory information provided by several modalities including chemoperception. *Drosophila* flies are particularly attracted by complex odours combining volatile molecules from yeast, pheromones and microbe-metabolized food. Based on a recent study revealing that adult male courtship behaviour can be affected by early preimaginal exposure to maternally-transmitted egg factors, we wondered whether a similar exposure could affect free-flight odour tracking in flies of both sexes? Our main experiment consisted to test, in a wind tunnel, flies differently conditioned during preimaginal development. Each fly was presented to a dual choice of food labelled by groups of *D. melanogaster* or *D. simulans* flies of each sex. The combined effect of food with the *cis*-vaccenyl acetate pheromone (*cVA*), involved in aggregation behaviour, was also measured. In parallel, using the head-space method, we determined the "odorant" identity of the different labelled food tested. We also measured the antennal electrophysiological response to *cVA* in females and males resulting of the different preimaginal conditioning procedures. Our data indicate that flies differently modulated their flight response (take off, flight duration, food landing and preference), according to sex, conditioning and food choice. Our head-space analysis revealed that many food-derived volatile molecules diverged between sexes and species. Antennal responses to *cVA* showed a clear sex specific variation for conditioned flies, but not for control flies. In summary, our study indicates that preimaginal conditioning can affect *Drosophila* free flight behaviour in a sex specific manner.

**Key Words** - *cis*-Vaccenyl acetate, microbiota, preimaginal conditioning.

## INTRODUCTION

Flying allows insects to escape from predators and to predate other animals (Baines et al. 2014; Dickinson 2014; Misof et al. 2014) and also to disperse and find new food sources and/or potential mates. In *Drosophila melanogaster*, flight guidance is based upon converging information from several sensory modalities (proprioception, vision, mechanoperception, hygroperception and chemoperception — (Bhandawat et al. 2010; Budick and Dickinson 2006; Budick et al. 2007; Duistermars et al. 2009)). When they are at a relatively long distance from an odour source, flying *Drosophila* flies use mechanosensory sensory system to estimate wind velocity and olfaction to orient through the odour gradient (Budick et al. 2007; Dahake et al. 2018; Duistermars et al. 2009; Krishnan and Sane 2014). When they arrive near the odour source, they use visual and chemical signals to land on this source (Bhandawat et al. 2007; Budick and Dickinson 2006; Saxena et al. 2018). To detect volatile chemical cues, *Drosophila melanogaster* flies use sensory hairs (sensilla) covering the antennae, the maxillary palps (Stocker 1994) and the wings (Houot et al. 2017; Raad et al. 2016) whose signal influx are sent to specific (and/or sex-specific) brain centres which in turn trigger adapted behaviours according to sex and mating status (Couto et al. 2005; Das et al. 2017; Datta et al. 2008; Fishilevich et al. 2005; Ruta et al. 2010).

*D. melanogaster* adults mainly use three pheromone classes. First, sex-specific cuticular hydrocarbons (CHCs), mostly detected by gustation but also by close range olfaction, can either stimulate or inhibit courtship behaviour (Everaerts et al. 2010a; Everaerts et al. 2010b; Farine et al. 2012b; Ferveur and Sureau 1996; Jallon 1984). Second, several volatile compounds derived either from 7,11-heptacosadiene, the principal female CHC (Z4-11Al aldehyde; Lebreton, 2017 #3307) or from male 7-tricosene CHC (methyl-laurate, -myristate and -palmitate; (Dweck et al. 2015)) can change at some distance the behaviour of males and females. Third, 11-*cis*-vaccenyl acetate (*cVA*) (Butterworth 1969; Guiraudie-Capraz et al. 2007), a volatile lipid-derived substance, produced in the ejaculatory bulb of several *Drosophila* species, can be detected at a relatively long distance ((Bartelt et al. 1985b; Hedlund et al. 1996; Jaenike et al. 1992; Schaner et al. 1987; Schaner et al. 1989a; Schaner et al. 1989b; Symonds and Wertheim 2005)). *cVA* is transferred from the male into the female genital apparatus during copulation and subsequently deposited on eggs laid few days after copulation (Everaerts et al. 2018). When combined with other infochemicals, *cVA* can modulate several *Drosophila* subsocial behaviours. At a close distance, *cVA* combined with

male specific CHCs inhibits male-male courtship, stimulates female sexual receptivity and induces male-male aggression (Bartelt et al. 1985a; Butterworth 1969; Das et al. 2017; Ejima 2015; Fernandez and Kravitz 2013; Guiraudie-Capraz et al. 2007; Jallon et al. 1981; Kurtovic et al. 2007; Laturney and Billeter 2016; Lebreton et al. 2015; Schaner et al. 1987; Wang et al. 2011; Wertheim et al. 2005; Zawistowski and Richmond 1986). At a longer distance, *cVA* associated with volatile food metabolites resulting from the activity of gut-associated bacteria (Keeseey et al. 2016), and often deposited in frass, can enhance fly aggregation on food sources (Bartelt et al. 1985b; Das et al. 2017; Duménil et al. 2016; Lebreton et al. 2012). Recently, Cazalé-Debat et al. (2019) described the long-range effect on *D. melanogaster* free flight of *cVA* combined with CHCs and food-derived chemicals. This study (performed in a wind tunnel) showed that *cVA* and sex-specific CHCs interact with food volatile chemicals to induce sex-specific flight responses.

For long, responses to *cVA* have been considered to be stereotypic and unconditional. Recently, some of us discovered that early preimaginal exposure to maternally-transmitted substances,—*cVA* likely associated with microbes— induced partial suppression of male courtship inhibition to *cVA* (Everaerts et al. 2018). Here we tested *Drosophila* female and male free flight response to a dual choice of food labelled by flies of various genotypes and added, or not, with *cVA*. Focal flies were differently exposed during their early preimaginal development by maternally-transmitted substances. Using headspace, we determined the identity of the volatile substances emitted by the various fly-labelled food types. Moreover, we measured the antennal electrophysiological response to *cVA* of flies resulting of different preimaginal conditionings.

## METHODS AND MATERIALS

### *Drosophila* Strains and Rearing

We used a *Drosophila melanogaster* wild-type strain: Canton-S (CS) and a *Drosophila simulans* wild-type strain (line #K509, a gift from Prof. Daisuke Yamamoto). Flies were raised on yeast/cornmeal/agar medium [for 1 L of food: 50 g of yeast, 66 g of maize flour, 9 g of agar and 30 ml of Tegosept (®Apex) completed with distilled water] and kept under a 12:12 hour light/dark cycle at  $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  with  $65\pm 5\%$  humidity. All flies resulted from mass-

rearing stocks transferred every 2-3 days to avoid competition and regularly provide progeny. The flies were screened 2 to 6 hours after emergence under light CO<sub>2</sub> anaesthesia and kept at 24±0.5°C in same-sex groups (20 flies) when used for food labelling. Focal female flies tested in the wind tunnel experiment were kept in groups (x20) whereas focal males were isolated to prevent social interactions potentially affecting behaviour (Svetec and Ferveur 2005).

*Egg Collection and Treatment:* Focal flies resulted from eggs laid by Cs females (i) less than 24h after mating (D1), or at least 5 days after mating (D5). More precisely, one hour after subjective dawn, 30 males and 10 females, all 4-day-old Cs flies, were placed in a 30ml glass vial containing 4ml fresh plain food. After 3h, they were cold-anaesthetized (15min at 4°C). Then, males were discarded while females were transferred into egg-laying devices (50 mm Petri dish filled with 1 ml 3% agar striped with fresh yeast to stimulate egg-laying). After three hours, females were removed and eggs collected (D1). To produce D5 eggs, mated females (without males) were placed in rearing tubes for 4 days and then transferred into egg-laying devices and then discarded three hours later. We also tested flies resulting from D5 eggs deposited on food enriched with synthetic cVA (15 ng/mm<sup>3</sup>; D5+cVA).

As control focal flies, we used virgin Cs males and females randomly sampled from mass-rearing stocks, 2 to 6 hours after emergence under light CO<sub>2</sub> anaesthesia and kept at 24±0.5°C either individually or grouped according to the sex.

### Food Labelling

To investigate the effect of the molecules potentially involved in free flight odour tracking and landing preference, we labelled fresh plain laboratory food with live flies. To label food, 100 “labelling” flies were kept for 15 hours in a petri dish (Ø=5.4 cm) filled with 20g fresh food and covered by a plastic lid (h=6.4 cm) under similar experimental conditions as described above. Labelling flies were removed 24 hours before the flight experiment. The food was either labelled by (i & ii) *D. melanogaster* virgin females or males, (iii & iv) *D. simulans* virgin females or males, or (v) *D. melanogaster* virgin females and enriched with synthetic *cis*-Vaccenyl acetate (cVA). For cVA labelling, 100 ng cVA (® Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; 50 mg/ml solution in ethanol; purity > 98%) diluted in 5 µl hexane was added on a Whatman filter paper patch (Ø=1 cm, ® GE Healthcare Life Sciences) which was

deposited on fly-labelled food a few minutes prior to each test. We used plain laboratory food as control food.

### Wind Tunnel

The design of the wind tunnel was previously described in detail (Cazalé-Débat et al. 2019; Fry et al. 2008; Houot et al. 2018; Houot et al. 2017). It is made of clear acrylic (length=155 cm; width and height=30.5 cm) and is illuminated by four band strips of white LEDs (BDL-F300W-05-3528, Boulevard des LEDs, France; length=1 m) located below the tunnel base and separated with a red screen. Tracing paper was placed over the tunnel to homogenize the light intensity inside the flying section and the two lateral panels of the tunnel were covered with a randomized pattern consisting of black and white squares (side=3 cm). A “departure/starting” platform (height=16 cm) was placed in the downwind section at 90 cm from the two landing platforms (height=16 cm,  $\varnothing$ =1.7 cm) located in the upwind section. The two landing platforms — with a food source on top of each — were placed 10 cm from each lateral panel and were separated from each other by 7.5 cm. For each behavioural test, approximately 1 cm<sup>3</sup> of food was deposited on a microscope slide at the top of each platform. A humidifier (® OKOIA, AH400; Tianjin, China) was placed at the entrance of the airflow to maintain a constant humidity (65-75%) in the flying section. A laminar airflow (0.4 ms<sup>-1</sup>) was running through the section. After each session of tests (performed between 9:00 am and 3:00 pm), the wind tunnel was washed with a 70% ethanol solution, and the room was ventilated until the next day. The temperature and relative humidity of the room were 25±1°C and 60±5% respectively.

We measured several flight parameters and the landing preference in binary food choice assays. Subject flies were individually introduced with a mouth aspirator into an acclimation chamber (consisting of an acrylic tube;  $\varnothing$ =5 mm) separated by a gate from the inside of the wind tunnel. After 3 min acclimation, subjects were allowed to reach the part of the tube opening inside the wind tunnel. Once the fly reached the lift off platform, we successively noted (i) its latency (and frequency) for taking upwind flight, (ii) its “Time duration to reach food” (between upwind flight latency and landing latency), and (iii) in case of landing, the food source chosen (food choice preference). “Landing on food frequency” corresponds to the sum of landing frequencies on the two food sources. Each experiment lasted 10 min or less when the fly landed on a food source.

We tested several dual food choice combinations consisting of: (i) two plain food sources as a double control (PF/PF); (ii & iii) PF combined with food labelled either by Cs female (PF/FCs) or by Cs male flies (PF/MCs); (iv) FCs enriched or not with synthetic cVA (FCs/FCs+cVA); (v) FCs/MCs; (vi) food labelled by *D. simulans* females and by *D. simulans* males (FSim/MSim). In these experiments, we tested 31-130 individual flies.

Tunnel experiments were conducted with starving flies to stimulate upwind flight attraction (Lebreton et al. 2012). Basically, the night before the test, flies were individually kept in a glass vial only containing a piece of cotton wool moistened with 90  $\mu$ L of distilled water at 25°C.

### Identification of the Volatiles by HS-SPME-GC-MS

To analyze the volatile chemicals from the different food sources tested in the wind tunnel, we used Headspace-Solid Phase Micro-Extraction-GC-Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS).

Samplings were carried out with 12 different odour sources: plain food, *D. melanogaster* females and males (without or with food), *D. simulans* females and males (without or with food) (for each sampling type,  $3 \leq n \leq 4$ ).

The media to be analyzed were prepared 15 hours before sampling. Depending on the case, 5 g of plain food (cooked 3 days before and stored at 4 °C as regular laboratory medium) was kept plain or was labelled by 25 four-day old flies. Vials covered with a cotton mesh (to avoid excessive humidity), were maintained at room temperature condition. Before sampling, flies were discarded and the mesh cap was replaced by a teflon septum. These vials were placed at 26 °C for 1 hour. Then, a triphasic SPME fiber (30  $\mu$ m layers CAR-PDMS - 50  $\mu$ m layer DVB; SUPELCO), previously conditioned for 15min in a GC injector set at 240 °C, was introduced in the vial through the septum and exposed during 10min to the vapor phase inside the headspace.

To identify chemicals present in the headspace after odorant uptake analysis, we used a HP6890 GC coupled to a MSD 5973N selective detector (Agilent Technologies operated in the electron ionization mode 70eV). The HP6890 GC was fitted with a SPME injection port (splitless mode) set at 240 °C and with a DB-Wax capillary column (length 30m; ID 0.25mm; film thickness 0.050  $\mu$ m; Agilent® J&W). GC oven temperature was maintained at 40°C for 5 min, then raised to 240°C at 3 °C/min and maintained during 10min at this temperature.



Helium was used as the carrier gas at a linear velocity of 44 cm/s. The SPME fiber was introduced into the injector of the GC and desorbed for a 15min period. The MSD 5973N mass spectrometer scanned the ion mass fragments ( $m/z$ ) from 29 to 350. The ion source was set at 230 °C and the transfer line at 250 °C.

Chromatograms were analyzed with the MSD-ChemStation software (Agilent Technologies).

Identification of the volatile compounds was carried out by comparison of their mass spectra with those of Wiley (Wiley Registry 2020) and Inramass libraries (personal database). We did not take into account chemicals with  $m/z$  features distinctive of polydimethylsiloxane (PDMS;  $m/z = 73, 147, 207, 221, 281$ ) which are contaminants derived from the silica column.

#### EAG Assays.

Electrophysiological antennal responses of Cs, D1, D5 and D5+cVA virgin females and males stimulated by various doses of cVA were measured using electroantennography (EAG).

Living 3- to 7-day-old flies were secured in an Eppendorf 200  $\mu$ l cone, leaving the eyes and antennae exposed. EAGs were recorded with two glass capillary electrodes (tip diameter 2.8  $\mu$ m, filled with 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM Hepes Buffer). The reference electrode was inserted in the left eye, and the recording electrode was leaned against the distal part of the right third antennal segment without being inserted. The signal was amplified (total gain  $\times 5$ ), low-pass filtered (0.5 kHz) with a AxoPatch 2008 (Molecular Devices, Union City, CA, USA), and was digitized at 1 KHz (Digidata 1440A; Molecular devices) with Axoscope® (Axon™pCLAMP™ 11.1, Molecular devices) et Clampfit® (Molecular devices) softwares.

*Odor delivery system:* A 5-mm teflon tube held 10 mm from the insect antenna continuously delivered a humidified air stream (Pump Wisa; 1 L/min; using a bubbler with reverse osmosis water and fitted with a charcoal filter). Stimuli were applied by inserting in the teflon tube a Pasteur pipette 15 cm containing a small piece of filter paper (Whatman; 20 x 3 mm) loaded with 10  $\mu$ l of the odorant diluted in paraffin oil. An air puff (200 ms, 1 PSI) was delivered through the pipette with an electro-valve (Kendrion Kuhnke Micro solenoid valve, 64.060) controlled by a digital output module (PDES-02DX, NPI Electronics).

Odorants were presented every min in a fixed sequential pattern: (i) hexan-1-ol (Sigma-Aldrich,  $10^{-1}$  M) and heptan-2-one (Sigma-Aldrich,  $10^{-1}$  M) diluted in paraffin oil; (ii) pure paraffin oil; (iii) pure hexane (99%, Sigma-Aldrich); (iv) increasing *cVA* dose (1, 100, 300 and 500  $\mu$ g in hexane) and (v) hexan-1-ol. Initial stimulations with hexan-1-ol and heptan-2-one allowed us to check the electrical connection in order to obtain an obvious antennal signal response (Chertemps et al., 2012), while the final hexan-1-ol stimulation allowed us to check the stability of the fly physiological state. Liquid paraffin and pure hexane were set up as a blank controls. Each compound was tested at least in 15 flies who were replaced after each stimulation sequence.

Both the maximum depolarization amplitude (DA) elicited by a volatile stimulus and the repolarization time (RT) duration were measured and compared between groups of flies.

### Statistics

Behavioural frequencies (upwind flight and landing) were compared using the Wilks  $G^2$  likelihood ratio test completed with a computation of significance by cell (Fisher's exact test). While the choice between the two food sources was tested using the z-test, these choices were compared using the Wilks  $G^2$  test as described above.

Headspace results were analysed using principal component analysis (PCA; Pearson's correlation matrix type; with standardized values) with the amount of chemical used as variables and the type of fly (sex and species) used as individuals. PCA was also used to analyze EAG results with amplitude of depolarization and time of repolarization as variables and the treatment (CS, D1, D5 and D5+*cVA*) as individuals.

All statistical analyses were performed using XLSTAT Premium 2021.5.1.1220 (Addinsoft 2021).

## RESULTS

### Free Flight in a Wind Tunnel

To determine the effect of early exposure to *cVA* and other maternally transmitted factors, we measured free flight orientation in individual female and male flies tested to a dual food choice, in a wind tunnel. Beside control Cs flies, we tested flies resulting of (i) eggs laid less

than 24 hours after copulation (D1), (ii) eggs laid 5 days after copulation (D5) and (iii) D5 eggs raised in food enriched with *cVA* (D5+cVA).

We measured the frequencies of flies (i) taking upwind flight, (ii) landing on food, and (iii) landing on each food type (food choice) in females and males (Figures 1 and 2, respectively). We also measured the latency to take upwind flight and the flight duration between the starting platform and landing on the food (Suppl. Figure 1). The two latter parameters are either shown for all individuals or according to their choice to land on each food type. All parameters were determined relatively to the total number of flies tested. Beside plain food (PF), the different types of food consisted of food labelled by Cs males (MCs), by Cs females (FCs), by Cs females and enriched with *cVA* (FCs+cVA), or by *D.simulans* females (FSim) or *D.simulans* males (MSim).

In the PF/PF control choice assay (consisting of two similar PF sources), 56-75% females and 53-69% males took upwind flight while 32-47% and 39-51% respectively landed on food without showing preference. Their median upwind flight latency was 80-150sec and 91-163sec while their median flight duration lasted 14-42sec and 32-56sec. Cs females showed a shorter flight duration compared to D5+cVA females.

In the MCs/PF choice assay, 68-84% flies took upwind flight while 30-76% landed on food. However D1 females and males landed on food with a significantly lower frequency (30%) compared to the three other treatments. D1 flies, Cs males and D5 males clearly preferred landing on MCs food than on PF. Both the latency of upwind flight and the flight duration of these flies were generally similar to those found in the PF/PF assay. Only Cs males showed a delayed upwind flight latency compared to the three other treatments.

In the FCs/PF assay, 63-80% flies took upwind flight with a median latency of 146-173 sec in females while this was more variable in males (79-187sec) with a significant difference between Cs and D5 males. A slight difference in flight duration was found between D1 and D5+cVA females. No difference for landing frequency on food was noted. No food preference was noted except in D1 females which landed more frequently on PF than on FCs food.

In the choice assay involving food labelled by Cs females without or with *cVA* (FCs/FCs+cVA), 61-75% flies took upwind flight. Upwind flight latency was either similar between males (29-64sec) or longer in Cs females (198sec) compared to the three other

females (12-30sec). D1, D5 and D5+cVA female and male flies showed a strongly decreased landing frequency (28-34%) compared to Cs flies (59%). Also D1 and D5+cVA females preferred landing on FCs+cVA food than on FCs food whereas males showed no preference.

In the FCs/MCs assay, flies showed relatively high upwind flight (73-86%) and landing frequencies (54-69%). While their upwind flight latency was around 100 sec, their flight duration was often very brief (10-60sec). They showed no food preference except D5+cVA males which preferred landing on MCs food than on FCs food.

In the choice assay performed with *D.simulans*-labelled food (FSim/MSim), 66-77% flies took upwind flight while 42-60% females and 41-69% males landed on food. D1 males landed significantly less often on food than D5 and D5+cVA males. Female and male flies showed a very brief flight duration (12-35sec and 24-32sec, respectively). Moreover, Cs females showed a shorter flight than D1 females. Males showed a slight preference (or a tendency) to land on MSim (than on FSim) while focal females showed no food preference.

### Headspace Analysis of Compounds Present in Food Sources

To determine the identity of food compounds potentially involved in various aspects of free flight behavior in female and male flies, we performed a headspace analysis of most food sources tested in the tunnel (Figure 3A, B). In particular, we compared the volatile compounds produced by PF, FCs, MCs, FSim and MSim types of food.

Our PCA reveals a clear separation between the sexes for each species (*D.melanogaster* = Cs; *D.simulans*; Figure 3C). While FCs completely overlapped with PF and partly overlapped with MSim, the two other food types (MCs, FSim) showed a clear segregation. Each MCs and FSim food type was “correlated” with a large number of compounds (Figure 3D and Table 1). More precisely, MCs specific compounds correspond to acids (acetichydrazide, acetic, isovaleric, hexanoic, and isobutyric acids), to ethanal, acetoin, 6-methyl, 5-hepten-2-one, 2-propanol, pentanol, ethyl-acetate, ethyl-butyrate, ethyl-caprate, ethyl-9-decenoate, ethyl-hexanoate and ethyl-octanoate and to 3 other diverse compounds (5,5-dimethyl-2(5H)-furanone, methoxy-phenyl-oxime and  $\alpha$ -caryophyllen).

FSim specific volatile molecules are: heptanoic and propionic acids, aldehydes (butanal, decanal, dodecanal, nonanal, octanal, undecanal), 4-methyl-2-pentanone, alcohols (2-methyl-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 4-methyl-pentanol, butanol, pentanol and nonanol), and

diverse compounds such as dimethyl disulfide, 2-butoxyethanol, ethoxy-ethene, humulen, phenylmethane, 2-butamine and N-methyl-methanamine.

We performed a more extensive PCA to compare the compounds produced by flies on food with those produced by flies without food (Figure Supp 2; Table1). This indicates that compounds emitted by flies of the four genotypes (without food) largely overlapped and showed a large divergence with the chemical profiles corresponding to PF and fly-labelled food (FCs, MCs, FSim and MSim).

### Electrophysiological Antennal Response to *cVA*

To determine the involvement of the peripheral olfactory system in the perception of fly-labelled food and more particularly of *cVA*, we measured the electrophysiological response of female and male antennae stimulated with a range of *cVA* doses (1-500  $\mu\text{g}$ ). We took into account two parameters: the depolarization amplitude (DA) and the repolarize time (RT) duration. In control fly antennae, both parameters showed a dose-dependent increase with the *cVA* amount (Figure 4A). Based on this finding, we plotted the DA and the RT data obtained in individual Cs, D1, D5 and D5+*cVA* females and males. These data reveal several differences according to sex, *cVA* dose and treatment (Figure 4B).

Control solutions were either tested before the *cVA* stimulation (hexanol [1], heptanone and paraffin oil) or after the *cVA* stimulation test (hexanol [2]). The two hexanol stimulations and the paraffin oil stimulation induced slight differences which mostly remained within the error variation range while heptanone induced a divergent response (mostly due to increased RT) in D1 males and in D5 females compared to the other same-sex treatments (Suppl Figure 3).

All *cVA*-stimulated antenna showed an increasing DA with *cVA* doses while RT showed much less variation. In females, *cVA* doses  $\geq 100 \mu\text{g}$  induced similar electrophysiological responses in all treatments. The empty (0) and 1  $\mu\text{g}$  stimulations induced non-coherent responses. In males, stimulations with 1-500  $\mu\text{g}$  *cVA* induced similar slope-responses in Cs males whatever the dose tested. Cs male responses clearly diverged from those shown by D1, D5 and D5+*cVA* males. In particular, the latter males showed a less increased DA and almost no RT variation. This was particularly clear with the 1  $\mu\text{g}$  *cVA* dose.

The PCA analysis performed with all parameters extracted from these data reveals more subtle effects (Figure 4C). In particular, both sexes showed a substantial overlap for the

response of D5 and D5+cVA flies and a clear segregation of Cs and D1 flies. The segregation of the “D5/D5+cVA” group was mostly linked with DA (red arrows) induced by higher cVA doses (300-500 µg), in both sexes. D1 females segregation was related to RT (dashed blue arrows) induced by low (1 µg) or 0 cVA doses while Cs females segregation was related to the RT induced by 100 µg cVA. Differently, D1 males segregates with the DA induced by 1 and 100µg cVA while the segregation of Cs males is linked to the RT induced by the higher cVA doses (100-500 µg).

## DISCUSSION

The present study aimed to test whether early preimaginal exposure to maternally transmitted factors (cVA, microbes...) could affect free flight olfactory tracking behaviour in *Drosophila* flies. In particular, we compared individual flies resulting of eggs laid less than 24 hours (D1), or more than 5 days (D5) after the copulation of their progenitors. Since D5 eggs are devoid of cVA, we also tested flies resulting of D5 eggs exposed to cVA-rich food (D5+cVA). Flies resulting of these three “conditioning” experiences were compared to control Cs flies randomly sampled from culture vials. The pivotal experiment of our study was performed in a wind tunnel, to measure fly ability to take upwind flight and to land on food with regard to food preference in a dual food choice. Since most food sources tested in the wind tunnel were “contaminated” by flies of various genotypes, we hypothesized that these fly-labelled food sources emitted different volatile food-derived metabolites that were identified by headspace analysis. Moreover, to partly determine the involvement of the peripheral nervous system in the different flight responses shown by Cs, D1, D5 and D5+cVA males and females, we measured the electrophysiological response of their antenna to cVA.

Our free flight experiment revealed that preimaginal conditioning differently affected some behavioural aspects between the sexes. Most female and male groups showed very similar upwind flight frequencies to PF/PF control choice (61-80%) except Cs flies (53-56%). Although this decrease was not significant, its similar occurrence in both sexes indicates that plain food elicited less often upwind flight than fly-contaminated food. Also, Cs male-processed food (MCs in MCs/PF; FCs/MCs) elicited —not significantly— more frequent upwind flights in both sexes. Similarly, *D. simulans*-labelled food (MSim) elicited very frequent upwind male flights. Together, these data indicate that flies can detect food volatile

odors before initiating flight. In other words, their ability to discriminate odors determines the behavioural decision preceding their upwind flight.

Females and males showed a relatively similar variation for their “Landing on food” frequencies. Relatively low landing responses were induced in all fly groups by the PF/PF control and by the “FCs/FCs+cVA” choice except in Cs flies. The “FSim/MSim choice” induced low responses in most females but only in D1 males. The “MCs/PF choice induced significantly less responses in D1 flies compared to the three other conditions. How can we interpret the decreased “landing on food” frequency shown by these groups of flies? Four remarks may help to understand such variation. First, D5 and D5+cVA flies showed similar responses. Second, D1 flies landed less often in “MCs/PF” than in “FCs/MCs” choice, indicating that unlike PF, FCs masked the repulsive (or non attractive) effect induced by MCs on D1 flies. Third, flies resulting from the three conditioning groups —but not Cs—were repulsed by cVA added in FCs. Fourth, the “FSim/MSim” choice induced a clear sex difference: most females, but only D1 males, showed low landing frequencies.

The examination of the “food choice” preference can bring some light on the analysis of the previous parameter. In the “MCs/PF” choice, all, but D5+cVA flies preferred —significantly or not— MCs over PF. Moreover, D5 males landed preferentially on MSim (more than on FSim), while D5+cVA males preferred MCs (over FCs). These data indicate that cVA added in the preimaginal diet affected some —but not all— male behavioural responses. However, the fact that all males were indifferent to cVA-rich food in the “FCs/FCs+cVA” choice test suggests that in the “MCs/PF” choice test, male behaviour was not driven by cVA but by other factors specifically provided by *D. melanogaster* such as cuticular hydrocarbons (CHCs) and/or microbes.

Beside the parallel effect described for the “MCs/PF” choice in both sexes, several sex differences were noted: D1 females avoided FCs (in “FCs/PF” choice) while D1 and D5+cVA females preferred cVA-rich food (in “FCs/FCs+cVA” choice). If D1 and D5+cVA females are attracted by cVA rich food, this indicates that such preference could allow them to find —in nature— a food source labelled by recently mated females and by males. Differently, non-cVA conditioned D5 females were not attracted to cVA rich food indicating that, in nature, they prefer to visit food sources with no, or fewer males and mated females. Consequently (i) D5 females would be subjected to less sexual harassment (Makowicz & Schlupp, 2013) and (ii) their larvae exposed to a reduced competition for food (Wertheim et al., 2006). In turn, a

low adult male density could reduce the probability for a female to choose the most appropriate male, with possible negative effects on the offspring fitness (Kohlmeier et al. 2021; Wertheim 2002) and an increased risk to be parasitized in lower population density (Hamilton 1971).

The difference between D5+cVA and D1 flies indicates that cVA addition in the preimaginal diet did not mimic its maternal transmission during egg laying. As previously discussed (Everaerts et al. 2018), the difference between D1 and D5+cVA is not only related to cVA concentration and nature (biological vs synthetic), but also to its dispersion pattern — dotted vs homogenous— in the food and the simultaneous presence/absence of microbes on the embryonic chorion (Bakula 1969). Other factors could also be involved such as ACPs (Herndon and Wolfner 1995), antibiotic peptides produced by the ejaculatory bulb (Wolfner 2002) and male CHCs (Duménil et al. 2016; Laturney and Billeter 2016). Moreover, we do not know whether microbes present on D1 and D5 eggs are similar or not. In nature, cVA is deposited superficially on the food by females laying their first post-mating eggs followed by mating plug ejection (Laturney and Billeter 2016; Lung and Wolfner 2001). cVA is also deposited by males either by passive transfert (Farine et al. 2012a) or in their feces and fecal droplets (Keeseey et al. 2016; Mercier et al. 2018). All these sources produce an heterogeneous and superficial distribution of cVA onto the substrate, contrasting with the homogeneous distribution in the medium added with synthetic cVA. In the first case, first and second instar larvae crawling deeply into the food encounter an intermitent contact with cVA, while an homogeneous cVA food induces a constant exposure. These two exposure types could differently affect early preimaginal conditioning process (Durisko et al. 2014).

The headspace experiment focused on the quality of food sources tested in the wind tunnel. This highlighted the existence of a strong sexual dimorphism within each species (*D. melanogaster* and *D. simulans*). The inter-sex difference for volatile chemicals produced by flies interacting on the food may explain, at least partly, food preference in some of our tests. The high number of compounds diverging between genotypes make it currently uneasy to point out the molecule(s) potentially involved in the multiple flight decisions (upwind flight, landing, choice). However, the clear inter-sex difference taken together with the “FCs – MSim” overlap (both genotypes strongly diverging for their CHCs) suggest that the difference of volatile chemicals is not only linked to CHCs but also to other factors, likely microbes involved in food and CHC degradation. Indeed, some volatile compounds detected are related to bacterial activity (isovaleric, hexanoic, and isobutyric acids, ethanal, acetoin and ethyl



butyrate) and/or to yeast activity (hexanoic acid, acetoin, ethyl butyrate, hexanoate and 9-decenoate) (Becher et al. 2012; Beck et al. 2000; Farine et al. 2014; Palanca et al. 2013; Ryu et al.). The hypothesis of a “food-microbe-CHC” interaction is reinforced by the PCA comparison between flies without food (showing a important overlap without regard to sex and species) segregating far away from fly-labelled food types (Fig. Suppl 2).

The electrophysiological experiment was an attempt to explore, in the peripheral olfactory system, the influence of preimaginal conditioning on olfactory-driven free flight in adults. This experiment was designed to compare the antennal response to *cVA* of Cs, D1, D5 and D5+*cVA* females and males. We chose *cVA* since it is a compound potentially involved both in some of the behavioural responses observed in the wind tunnel (present study) and in preimaginal conditioning (Everaerts et al. 2018). We also chose *cVA* by default: the identity of food-derived compounds potentially involved in food preference remained unknown. The antennal response shown by both Cs sexes (control flies) was similar with a proportional relationship between the depolarization amplitude (DA) and the repolarization time (RT), DA increasing with the *cVA* dose. This is supported by a report showing similar antennal response to *cVA* in Cs females and males (Kurtovic et al. 2007). Here, we observed marked sexual differences in differently conditioned flies. Within the 100-500  $\mu\text{g}$  *cVA* range, females showed DA/RT “regression slopes” relatively well aligned with those of Cs control females. Differently, within the 1-500  $\mu\text{g}$  *cVA* range, males showed relatively flat DA/RT “correlation slope”, indicating the absence of RT/DA correlation, likely due to DA which was shorter than in Cs males. The sexually dimorphic response of antennae stimulated by *cVA* may partly explain sex-specific variations for dual food choice. In particular, these differences could be caused by the alteration of sex specific features of the *D.melanogaster* antennae: (i) the male funiculus harbors more trichoid sensillae than the female (Xu et al. 2005); (ii) the esterase-6 enzyme, involved in *cVA* degradation, shows a higher expression in males than in females (Chertemps et al. 2012); (iii) the odorant-binding protein OBP69a, required for the activity of *cVA*-responsive neurons, is reciprocally regulated by *cVA* between the sexes (*cVA* stimulation decreases the OBP level in males whereas it increases the OBP level in females (Bentzur et al. 2018)).

Moreover, behavioural differences observed between conditioned females and males in the wind tunnel could also be related to a different integration in olfactory signals in their brain. Indeed, since EAG was performed on immobilized flies, many sensory aspects shown by free flying *Drosophila* were not taken into account such as vision and mechanosensation (Bentzur

et al. 2018; Dahake et al. 2018; Saxena et al. 2018). *Drosophila* uses information from mechanoreceptors on wings and halteres and in campaniform sensillae to control flight (Deora et al. 2021). Chemosensory receptors on the anterior wing margin can also change some aspects of free flight (Houot et al. 2017; Raad et al. 2016).

In summary, our study reveals that preimaginal exposure to *cVA* and/or to unidentified maternally transmitted factors can affect several aspects of free flight olfactory tracking behaviour in *Drosophila* females and males. Such plasticity effect could underly natural variation of behavioural dispersion in *Drosophila* populations allowing differently conditioned flies to explore more diverse food patches. Is it possible that a female, mated more than 5 days earlier, lay eggs in a food patch devoid of conspecifics? In nature, this hypothesis could happen considering that (1) mated and virgin females show similar flight ability (Becher et al. 2010) and (2) *Drosophila* flies can show a very long range flight capacity (~12 km in a single flight (Leitch et al. 2021)), this increasing the probability for a fly to land on a spot without conspecifics.

## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1** Flight and landing preference in single female flies tested for food labelled by flies of various genotypes. The histograms represent (top row) the frequency of female flies taking upwind flight (calculated from the total number of flies tested: see top of each histogram bar), (medium row) the overall landing frequency (calculated from all individuals), and (bottom row) the landing preferences on a dual food choice. At the top of each histogram group (*delimited by dashed lines*) the dual food choice tested are indicated (*from left to right*): “plain food/plain food” (PF/PF), “food labelled by Cs males/plain food” (MCs/PF), “food labelled by Cs females/plain food” (FCs/PF), “food labelled by Cs females/food labelled by Cs females and enriched with synthetic *cVA*” (FCs/FCs+*cVA*), “food labelled by Cs females/food labelled by Cs males” (FCs/MCs) and “food labelled by *D.simulans* females/food labelled *D.simulans* males” (FSim/MSim). For each dual food choice, we compared Cs flies resulting from different preimaginal conditioning. We tested (*from left to right*) (i) Cs control flies (empty bars or grey bars) to flies resulting from (ii) eggs laid less

than 24 hours after copulation (D1; blue bars), (iii) eggs laid at least 5 days after copulation (D5; green bars) and (iv) D5 eggs raised in cVA-rich food (D5+cVA; purple bars). For food preference, the frequency of flies landing on each food source is represented by twin bars, the bar with lighter color density depicts the food shown on the left side of the dual choice and the bar with darker color density depicts the food on the right side.

For each dual food choice, the differences between upwind flight and between landing frequencies were tested with the Wilks  $G^2$  likelihood ratio test completed with a computation of significance by cell (Fisher's exact test), whereas landing preference was tested with the  $z$ -test, and the corresponding frequencies were compared between the different LFs using the Wilks  $G^2$  likelihood ratio test. For the two frequency parameters, significant differences are indicated by different letters at  $\alpha = 0.05$ , while the level of significance for food preference is represented (or not) by asterisks (\*:  $\alpha < 0.05$ ; \*\*:  $\alpha < 0.01$ ; \*\*\*:  $\alpha < 0.001$ ; no star: not significant). (*Upwind flight frequency*: Wilks  $G^2$  likelihood ratio test, PF/PF:  $G^2_{(3df)}=5.95$ ,  $p=0.114$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=5.41$ ,  $p=0.148$ , FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=2.79$ ,  $p=0.425$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}=2.28$ ,  $p=0.524$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}=0.07$ ,  $p=0.811$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}=1.90$ ,  $p=0.598$ ; *Landing on food frequency*: PF/PF:  $G^2_{(3df)}=0.90$ ,  $p=0.273$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=40.51$ ,  $p < 10^{-4}$ , FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=5.02$ ,  $p=0.170$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}=12.47$ ,  $p=0.006$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}=1.29$ ,  $p=0.722$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}=0.89$ ,  $p=0.272$ ; *Food Choice Frequency*: —for sake of clarity, only the significant values are provided— : MCs/PF- D1:  $z = 4.56$ ,  $p = 0.0002$ , FCs/PF - D1:  $z = 2.89$ ,  $p = 0.004$ , FCs/FCs+cVA - D1:  $z = 3.27$ ,  $p = 0.0012$ , FCs/FCs+cVA - D5+cVA:  $z = 3.71$ ,  $p = 0.0002$ , MSim/Fsim - Cs:  $z = 3.39$ ,  $p = 0.0008$ , Sim/Fsim - D1:  $z = 3.67$ ,  $p = 0.0004$ , MSim/Fsim - D5:  $z = 2.98$ ,  $p = 0.003$ ; *Food Choice Frequency Differences*: PF/PF:  $G^2_{(3df)}=1.26$ ,  $p=0.731$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=7.66$ ,  $p=0.049$ , FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=6.69$ ,  $p=0.083$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}=9.32$ ,  $p=0.025$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}=2.43$ ,  $p=0.489$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}=1.73$ ,  $p=0.630$ ). Two other flight parameters (upwind flight latency and time to reach food) are shown in the Supplemental Figure 1.

**Fig. 2** Flight and landing preference in single male flies tested for food labelled by flies of various genotypes. The histograms represent (top row) the frequency of male flies taking upwind flight (calculated from the total number of flies tested: see top of each histogram bar), (medium row) the overall landing frequency (calculated from all individuals), and (bottom row) the landing preferences on a dual food choice. For parameters and statistics, please refer

to the legend of Figure 1. Two other flight parameters (upwind flight latency and time to reach food) are shown in the Supplemental Figure 1.

(Upwind flight frequency: Wilks  $G^2$  likelihood ratio test, PF/PF:  $G^2_{(3df)}=0.69$ ,  $p=0.297$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=0.87$ ,  $p=0.276$ , FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=0.16$ ,  $p=0.711$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}=1.52$ ,  $p=0.72$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}=0.82$ ,  $p=0.949$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}=1.82$ ,  $p=0.611$ ; Landing on food frequency: PF/PF:  $G^2_{(3df)}=1.89$ ,  $p=0.596$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=27.19$ ,  $p<10^{-4}$  FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=4.12$ ,  $p=0.248$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}=7.96$ ,  $p=0.047$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}=1.06$ ,  $p=0.787$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}=10.86$ ,  $p=0.013$ ; ; Food Choice Frequency: MCs/PF- Cs:  $z = 3.65$ ,  $p = 0.0002$ , MCs/PF- D1 :  $z = 3.99$ ,  $p < 10^{-4}$ , MCs/PF- D5:  $z = 3.52$ ,  $p = 0.0002$ , FCs/FCs+cVA- D5:  $z = 8.73$ ,  $p < 0. 10^{-4}$ , MSim/Fsim- D1:  $z = 3.13$ ,  $p = 0.002$ ; Food Choice Frequency Differences: PF/PF:  $G^2_{(3df)}=2.49$ ,  $p=0.476$ , MCs/PF:  $G^2_{(3df)}=9.406$ ,  $p=0.024$ , FCs/PF:  $G^2_{(3df)}=3.62$ ,  $p=0.306$ , FCs/FCs+cVA:  $G^2_{(3df)}= 0.90$ ,  $p=0.825$ , FCs/Mcs:  $G^2_{(3df)}= 4.57$ ,  $p=0.206$ , Fsim/MSim:  $G^2_{(3df)}= 4.10$ ,  $p=0.251$ ). Two other flight parameters (upwind flight latency and time to reach food) are shown in the Supplemental Figure 1.

**Fig. 3** Headspace analysis of volatile chemicals released by food labelled by flies of various genotypes. To analyze the volatile chemicals from several food sources labelled by flies and tested in the wind tunnel, we used (A) Headspace-Solid Phase Micro-Extraction-GC-Mass Spectrometry. (B) We obtained chromatograms with many peaks, each one corresponding to an identified volatile compound (labelled by a number; please refer to the nomenclature shown on Table 1). (C) We used a principal component analysis (PCA) to compare all the compounds released by plain food (PF) to food sources labelled by (i) Cs females (FCs), (ii) Cs males (MCs), (iii) *D. simulans* females (FSim), and (iv) *D. simulans* males (MSim). (D) Each ellipse representing each food source corresponds to the compounds (identified with their numbers) located at a similar place on the PCA shown on C. For each sampling type,  $3 \leq n \leq 4$ . We also tested volatile compounds emitted by flies of similar genotypes but without food (see Supplemental Figure 2).

**Fig. 4** Electrophysiological antennal response in variously conditioned flies stimulated by *cis*-Vaccenyl acetate (*cVA*) and other control chemicals. (A) Each live fly was maintained with its head protruding at the tip of a pipette cone. A puff of air with various *cVA* doses was

sent onto the whole antenna whose electrical response was recorded according to the *cVA* dose. The time at which the stimulation took place is indicated with an arrow below the response curves with its duration shown as a grey bar. For each electrical response, we measured both its amplitude corresponding to the depolarization potential (measured in mV) and the duration of repolarization (return until the baseline; measured in seconds). (B) We determined in females (left) and in males (right), the relationship between the amplitude of depolarization (x-axis; red color) and repolarization time (y-axis; blue color), for each *cVA* dose. In each frame, we compared the response of Cs flies (plain dark lines) to the response of conditioned flies resulting from D1 eggs (D1; long blue dashed lines), D5 eggs (D5; medium green dashed lines) and D5 eggs raised in *cVA* (D5+*cVA*; dark dotted lines). (C) The global response of each type of flies was compared using a PCA taking in account both the depolarization amplitude (red plain arrows) and repolarization time (blue plain arrows) induced by all *cVA* doses. The PCA also takes in account the depolarization amplitude (red dashed arrows) and repolarization time (blue dashed arrows) induced by all control substances (see Figure Supplemental 3). Females are shown on the top PCA; males are shown on the bottom PCA. Each compound was tested at least in 15 flies of each sex.

## SUPPLEMENTAL FIGURE CAPTIONS

**Supplemental Fig. 1** Flight of single flies tested for food labelled by flies of various genotypes. We measured upwind flight latency and time to reach food in single females (top histograms) and males (bottom histograms). These data correspond to the flies shown in Figures 1 and 2. For parameters and statistics, please refer to the legends of Figures 1 and 2.

**Supplemental Fig. 2** Headspace analysis of volatile chemicals released by food labelled by flies of various genotypes and by flies without food. (A) represents the PCA analysis with all head-space analysis. (B) provides the compounds involved in ellipses segregation shown on A. Numbers refer to compounds shown in Table 1. (C) represents the PCA with the flies of the four genotypes and an empty control (Ctrl) while (D) represents the compounds involved in ellipse segregation shown on C. For parameters and statistics, please refer to Figure 3.

**Supplemental Fig. 3** Electrophysiological response of the antenna of variously conditioned live female and male flies stimulated by several control chemicals. For both females (left) and males (right), we determined the relationship between the amplitude of depolarization (x-axis; red color) and repolarization time (y-axis; blue color), for each control chemical tested either before stimulation by *cVA* (Hexanol [1], Heptanone, Paraffin oil) or after stimulation by *cVA* (Hexanol [2]). In each frame, we compared the response of Cs flies (plain dark lines) to the response of conditioned flies resulting from D1 eggs (D1; long blue dashed lines), D5 eggs (D5; medium green dashed lines) and D5 eggs raised in *cVA* (D5+*cVA*; dark dotted lines). For parameters and statistics, please refer to Figure 4.

## REFERENCES

Addinsoft (2021) XLSTAT 2021: Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel. Addinsoft, Paris, France.

Baines CB, McCauley SJ, Rowe L (2014) The interactive effects of competition and predation risk on dispersal in an insect *Biology Letters* 10:20140287 doi:10.1098/rsbl.2014.0287

Bakula M (1969) The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Invertebr Pathol* 14:365-374 doi:10.1016/0022-2011(69)90163-3. PMID: 4904970.

Bartelt RJ, Jackson LL, Schaner AM (1985a) Ester Components Of Aggregation Pheromone Of *Drosophila-Virilis* (Diptera, Drosophilidae) *J Chem Ecol* 11:1197-1208

Bartelt RJ, Schaner AM, Jackson LL (1985b) Cis-Vaccenyl acetate as an aggregation pheromone In *Drosophila melanogaster* *J Chem Ecol* 11:1747-1756 doi:10.1007/bf01012124

Becher PG, Bengtsson M, Hansson BS, Witzgall P (2010) Flying the fly: long-range flight behavior of *Drosophila melanogaster* to attractive odors *J Chem Ecol* 36:599-607 doi:10.1007/s10886-010-9794-2

Becher PG et al. (2012) Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development. *Functional Ecology* 26:822-828 doi:10.1111/j.1365-2435.2012.02006.x

Beck CDO, Schroeder B, Davis RL (2000) Learning Performance of Normal and Mutant *Drosophila* after Repeated Conditioning Trials with Discrete Stimuli *The Journal of Neuroscience* 20:2944 doi:10.1523/JNEUROSCI.20-08-02944.2000

Bentzur A et al. (2018) Odorant binding protein 69a connects social interaction to modulation of social responsiveness in *Drosophila* *PLoS Genet* 14:e1007328 doi:10.1371/journal.pgen.1007328

Bhandawat V, Maimon G, Dickinson MH, Wilson RI (2010) Olfactory modulation of flight in *Drosophila* is sensitive, selective and rapid *J Exp Biol* 213:3625-3635 doi:10.1242/jeb.040402

Bhandawat V, Olsen SR, Gouwens NW, Schlieff ML, Wilson RI (2007) Sensory processing in the *Drosophila* antennal lobe increases reliability and separability of ensemble odor representations *Nat Neurosci* 10:1474-1482

Budick SA, Dickinson MH (2006) Free-flight responses of *Drosophila melanogaster* to attractive odors *J Exp Biol* 209:3001-3017 doi:10.1242/jeb.02305

Budick SA, Reiser MB, Dickinson MH (2007) The role of visual and mechanosensory cues in structuring forward flight in *Drosophila melanogaster* *J Exp Biol* 210:4092 doi:10.1242/jeb.006502

Butterworth FM (1969) Lipids of *Drosophila*: a newly detected lipid in the male. *Science* 163:1356-1357 doi:10.1126/science.163.3873.1356

Cazalé-Débat L, Houot B, Farine JP, Everaerts C, Ferveur JF (2019) Flying *Drosophila* show sex-specific attraction to fly-labelled food *Scientific reports* 9:14917 doi:10.1038/s41598-019-51351-1

Chertemps T, Francois A, Durand N, Rosell G, Dekker T, Lucas P, Maibeche-Coisne M (2012) A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila* *BMC Biol* 10:56 doi:10.1186/1741-7007-10-56

Couto A, Alenius M, Dickson BJ (2005) Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system *Curr Biol* 15:1535-1547 doi:10.1016/j.cub.2005.07.034

Dahake A, Stöckl AL, Foster JJ, Sane SP, Kelber A (2018) The roles of vision and antennal mechanoreception in hawkmoth flight control *eLife* 7:e37606 doi:10.7554/eLife.37606

Das S, Trona F, Khallaf MA, Schuh E, Knaden M, Hansson BS, Sachse S (2017) Electrical synapses mediate synergism between pheromone and food odors in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 114: E9962–E9971 doi: 10.1073/pnas.1712706114.

Datta SR et al. (2008) The *Drosophila* pheromone cVA activates a sexually dimorphic neural circuit *Nature* 452:473-477 doi:10.1038/nature06808

Deora T, Sane SS, Sane SP (2021) Wings and halteres act as coupled dual oscillators in flies *eLife* 10:e53824 doi:10.7554/eLife.53824

Dickinson MH (2014) Death Valley, *Drosophila*, and the Devonian toolkit. *Annu Rev Entomol* 59:51-72 doi:10.1146/annurev-ento-011613-162041

Duistermars BJ, Chow DM, Frye MA (2009) Flies require bilateral sensory input to track odor gradients in flight *Curr Biol* 19:1301-1307 doi:10.1016/j.cub.2009.06.022

Duménil C et al. (2016) Pheromonal cues deposited by mated females convey social information about egg-laying sites in *Drosophila melanogaster*. *J Chem Ecol* 42:259-269 doi:10.1007/s10886-016-0681-3.

Durisko Z, Kemp R, Mubasher R, Dukas R (2014) Dynamics of Social Behavior in Fruit Fly Larvae *PLoS One* 9:e95495 doi:10.1371/journal.pone.0095495

Dweck HKM et al. (2015) *Drosophila* aggregation and mating pheromones *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2829-E2835 doi:10.1073/pnas.1504527112

Ejima A (2015) Pleiotropic actions of the male pheromone cis - vaccenyl acetate in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 201:927-932

Everaerts C, Cazalé-Debat L, Louis A, Pereira E, Farine JP, Cobb M, Ferveur JF (2018) Pre-imaginal conditioning alters adult sex pheromone response in *Drosophila*. *PeerJ eCollection* 2018. doi:10.7717/peerj.5585

Everaerts C, Farine JP, Cobb M, Ferveur JF (2010a) *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited: mating status alters cuticular profiles. *PLoS One* 5:e9607 doi:10.1371/journal.pone.0009607



Everaerts C, Lacaille F, Ferveur JF (2010b) Is mate choice in *Drosophila* males guided by olfactory or gustatory pheromones? *Animal Behaviour* 79:1135-1146 doi:10.1016/j.anbehav.2010.02.013

Farine J-P, Ferveur J-F, Everaerts C (2012a) Volatile *Drosophila* Cuticular Pheromones Are Affected by Social but Not Sexual Experience *PLoS One* 7:e40396 doi:10.1371/journal.pone.0040396

Farine JP, Cortot J, Ferveur JF (2014) *Drosophila* adult and larval pheromones modulate larval food choice. *Proc R Soc B* 281 doi:dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.0043

Farine JP, Ferveur JF, Everaerts C (2012b) Volatile *Drosophila* cuticular pheromones are affected by social but not sexual experience. *PLoS One* 7:e40396 doi:10.1371/journal.pone.0040396

Farine JP, Habbachi W, Cortot J, Roche S, Ferveur JF (2017) Maternally-transmitted microbiota affects odor emission and preference in *Drosophila* larva. *Scientific reports* 7 doi:10.1038/s41598-017-04922-z

Fernandez MP, Kravitz EA (2013) Aggression and courtship in *Drosophila*: pheromonal communication and sex recognition *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 199:1065-1076 doi:10.1007/s00359-013-0851-5

Ferveur JF, Sureau G (1996) Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster* *Proc R Soc Biol Sci Ser B* 263:967-973

Fishilevich E, Domingos AI, Asahina K, Naef F, Vosshall LB, Louis M (2005) Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila* *Current biology* : CB 15:2086-2096 doi:10.1016/j.cub.2005.11.016

Fry SN, Rohrseitz N, Straw AD, Dickinson MH (2008) TrackFly: virtual reality for a behavioral system analysis in free-flying fruit flies. *J Neurosci Methods* 171:110-117 doi:10.1016/j.jneumeth.2008.02.016

Guiraudie-Capraz G, Pho DB, Jallon JM (2007) Role of the ejaculatory bulb in biosynthesis of the male pheromone cis-vaccenyl acetate in *Drosophila melanogaster* *Integrative zoology* 2:89-99 doi:10.1111/j.1749-4877.2007.00047.x

Hamilton WD (1971) Geometry for the selfish herd *J Theor Biol* 31:295-311 doi.org/10.1016/0022-5193(71)90189-5

Hedlund K, Bartelt RJ, Dicke M, Vet LEM (1996) Aggregation pheromones of *Drosophila immigrans*, *D-phalerata*, and *D-subobscura* *J Chem Ecol* 22:1835-1844

Herndon LA, Wolfner MF (1995) A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:10114-10118 doi:doi:10.1073/pnas.92.22.10114

Houot B, Cazalé-Debat L, Fraichard S, Everaerts C, Saxena N, Sane SP, Ferveur J-F (2018) Gene regulation and species-specific evolution of free-flight odor-tracking in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 35:3-15 doi:10.1093/molbev/msx241

Houot B, Gigot V, Robichon A, Ferveur J-F (2017) Free-flight odor tracking in *Drosophila*: effect of wing chemosensors, sex, and pheromonal gene regulation. Scientific reports 7 doi:10.1038/srep40221

Jaenike J, Bartell RJ, Huberty AF, Thibault S, Libler JS (1992) Aggregations in mycophagous *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): candidate pheromones and field responses Ann Entomol Soc Am 85:696-704

Jallon JM (1984) A few chemical words exchanged by *Drosophila* during courtship and mating Behavior genetics 14:441-478

Jallon JM, Antony C, Benamar O (1981) An anti-aphrodisiac produced by *Drosophila melanogaster* males and transferred to females during copulation C R Acad Sci Ser III Sci Vie 292:1147-1149

Keesey IW, Koerte S, Retzke T, Haverkamp A, Hansson BS, Knaden M (2016) Adult frass provides a pheromone signature for *Drosophila* feeding and aggregation. J Chem Ecol 42:739-747 doi:10.1007/s10886-016-0737-4

Kohlmeier P, Zhang Y, Gorter JA, Su C-Y, Billeter J-C (2021) Mating increases *Drosophila melanogaster* females' choosiness by reducing olfactory sensitivity to a male pheromone Nature Ecology & Evolution 5:1165-1173 doi:10.1038/s41559-021-01482-4

Krishnan A, Sane SP (2014) Visual feedback influences antennal positioning in flying hawk moths The Journal of Experimental Biology 217:908 doi:10.1242/jeb.094276

Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ (2007) A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone Nature 446:542-546 doi:10.1038/nature05672

Laturney M, Billeter JC (2016) *Drosophila melanogaster* females restore their attractiveness after mating by removing male anti-aphrodisiac pheromones. Nature Communication 7:12322 doi:10.1038/ncomms12322

Lebreton S, Becher PG, Hansson BS, Witzgall P (2012) Attraction of *Drosophila melanogaster* males to food-related and fly odours J Insect Physiol 58:125-129 doi:10.1016/j.jinsphys.2011.10.009

Lebreton S et al. (2015) Feeding regulates sex pheromone attraction and courtship in *Drosophila* females. Sci Rep 5:13132 doi:10.1038/srep13132

Leitch KJ, Ponce FV, Dickson WB, van Breugel F, Dickinson MH (2021) The long-distance flight behavior of *Drosophila* supports an agent-based model for wind-assisted dispersal in insects Proceedings of the National Academy of Sciences 118:e2013342118 doi:10.1073/pnas.2013342118

Lung O, Wolfner MF (2001) Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein Insect Biochem Mol Biol 31:543-551 doi:https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00154-5

Mercier D, Tsuchimoto Y, Ohta K, Kazama H (2018) Olfactory landmark-based communication in interacting *Drosophila* Curr Biol 28:2624-2631.e2625 doi:10.1016/j.cub.2018.06.005

Misof B et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution Science 346:763-767 doi:doi:10.1126/science.1257570

Palanca L, Gaskett AC, Günther CS, Newcomb RD, Goddard MR (2013) Quantifying Variation in the Ability of Yeasts to Attract *Drosophila melanogaster* PLoS One 8:e75332 doi:10.1371/journal.pone.0075332

Raad H, Ferveur JF, Ledger N, Capovilla M, Robichon A (2016) Functional gustatory role of chemoreceptors in *Drosophila* wings. Cell reports 15:1442-1454 doi:10.1016/j.celrep.2016.04.040

Ruta V, Datta SR, Vasconcelos ML, Freeland J, Looger LL, Axel R (2010) A dimorphic pheromone circuit in *Drosophila* from sensory input to descending output Nature 468:686-690 doi:10.1038/nature09554

Ryu CM, Farag Ma Fau - Hu C-H, Hu Ch Fau - Reddy MS, Reddy Ms Fau - Kloepper JW, Kloepper Jw Fau - Paré PW, Paré PW Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*

Saxena N, Natesan D, Sane SP (2018) Odor source localization in complex visual environments by fruit flies The Journal of Experimental Biology 221:jeb172023 doi:10.1242/jeb.172023

Schaner AM, Bartell RJ, Jackson LL (1987) (z)-11-Octadecenyl acetate, an aggregation pheromone in *Drosophila simulans* J Chem Ecol 13:1777-1786

Schaner AM, Benner AM, Leu RD, Jackson LL (1989a) Aggregation pheromone of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila yakuba*, and *Drosophila rajasekari* J Chem Ecol 15:1249-1257 doi:10.1007/BF01014827

Schaner AM, Graham KJ, Jackson LL (1989b) Aggregation pheromone characterization and comparison in *Drosophila ananassae* and *Drosophila bipectinata* J Chem Ecol 15:1045-1055 doi:10.1007/BF01015198

Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review Cell Tissue Res 275:3-26 doi:10.1007/BF00305372

Svetec N, Ferveur JF (2005) Social experience and pheromonal perception can change male-male interactions in *Drosophila melanogaster* J Exp Biol 208:891-898

Symonds MR, Wertheim B (2005) The mode of evolution of aggregation pheromones in *Drosophila* species J Evol Biol 18:1253-1263 doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00971.x

Wang L et al. (2011) Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila* Nat Neurosci 14:757-762 doi:10.1038/nn.2800

Wertheim B, van Baalen EJ, Dicke M, Vet LE (2005) Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary ecological perspective Annu Rev Entomol 50:321-346 doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123329

Wertheim BM, J.; Vet, L.E.M.; Dicke, M. (2002) Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae, and micro-organisms Ecol Entomol 27:608-617

Wiley Registry (2020) 12th Edition/NIST 2020 Mass Spectral Library.

Wolfner MF (2002) The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in *Drosophila* *Heredity* 88:85-93  
doi:10.1038/sj.hdy.6800017

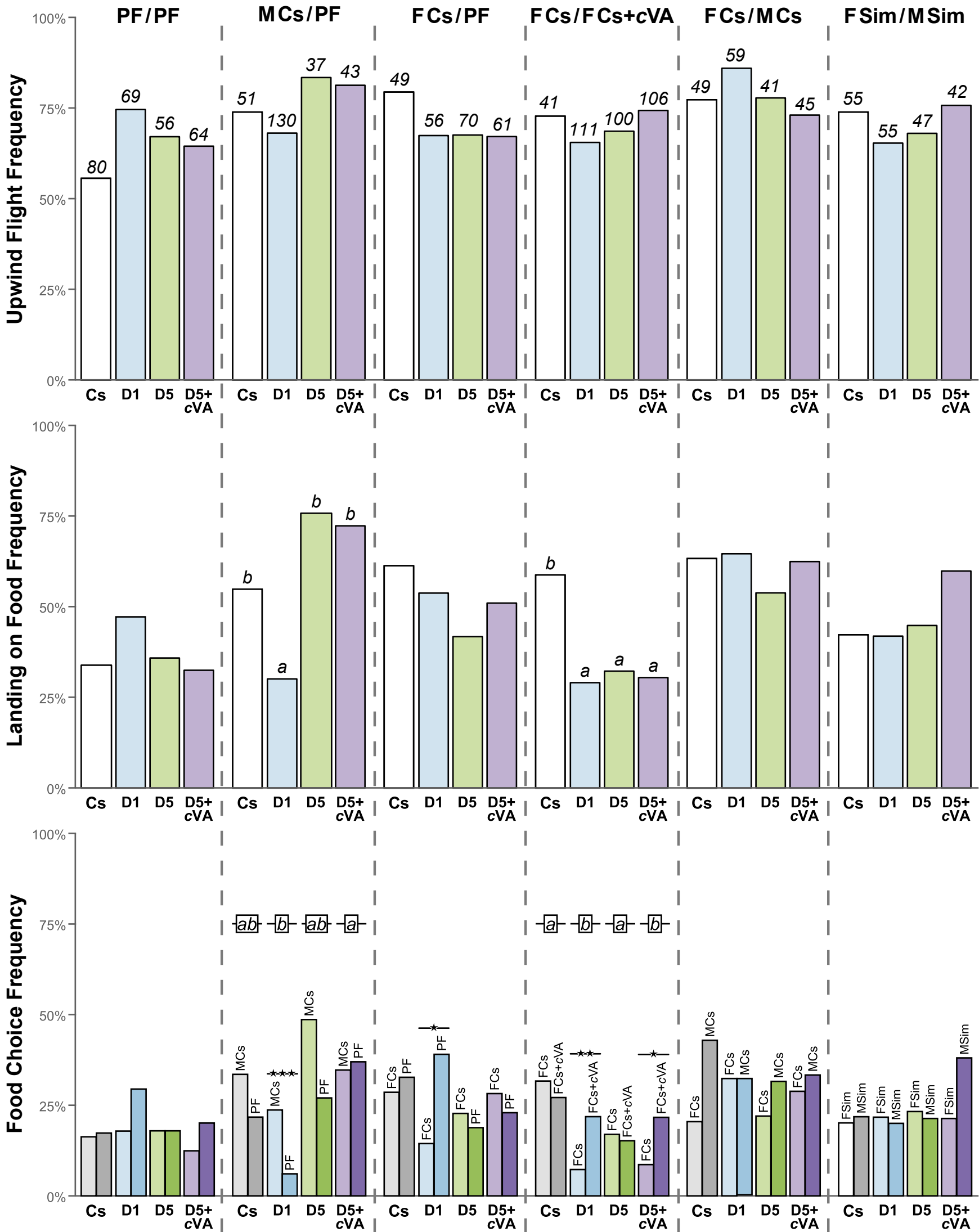
Xu P, Atkinson R, Jones DN, Smith DP (2005) *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons *Neuron* 45:193-200  
doi:10.1016/j.neuron.2004.12.031

Zawistowski S, Richmond RC (1986) Inhibition Of Courtship And Mating Of *Drosophila-Melanogaster* By The Male-Produced Lipid, Cis-Vaccenyl Acetate *J Insect Physiol* 32:189-192

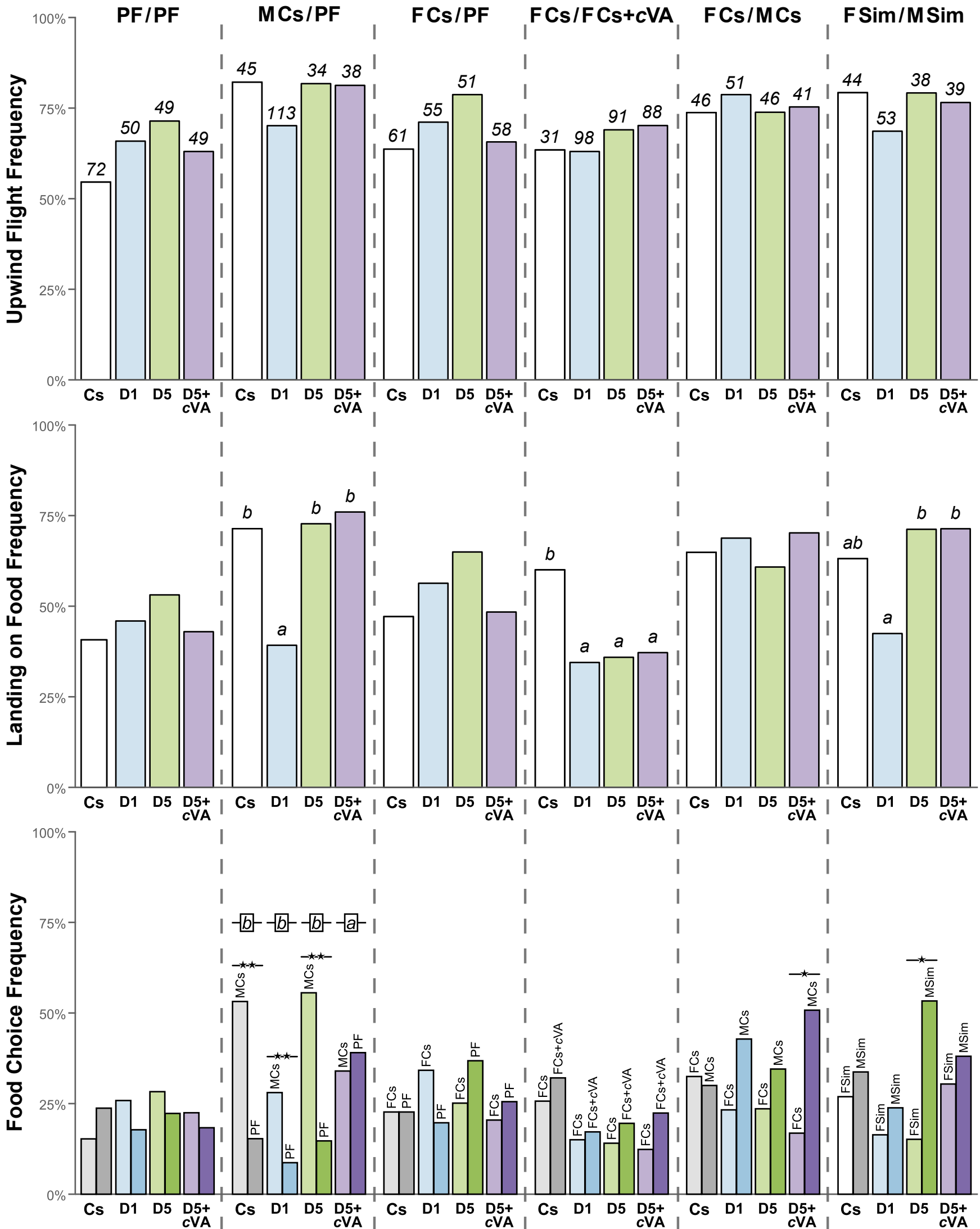




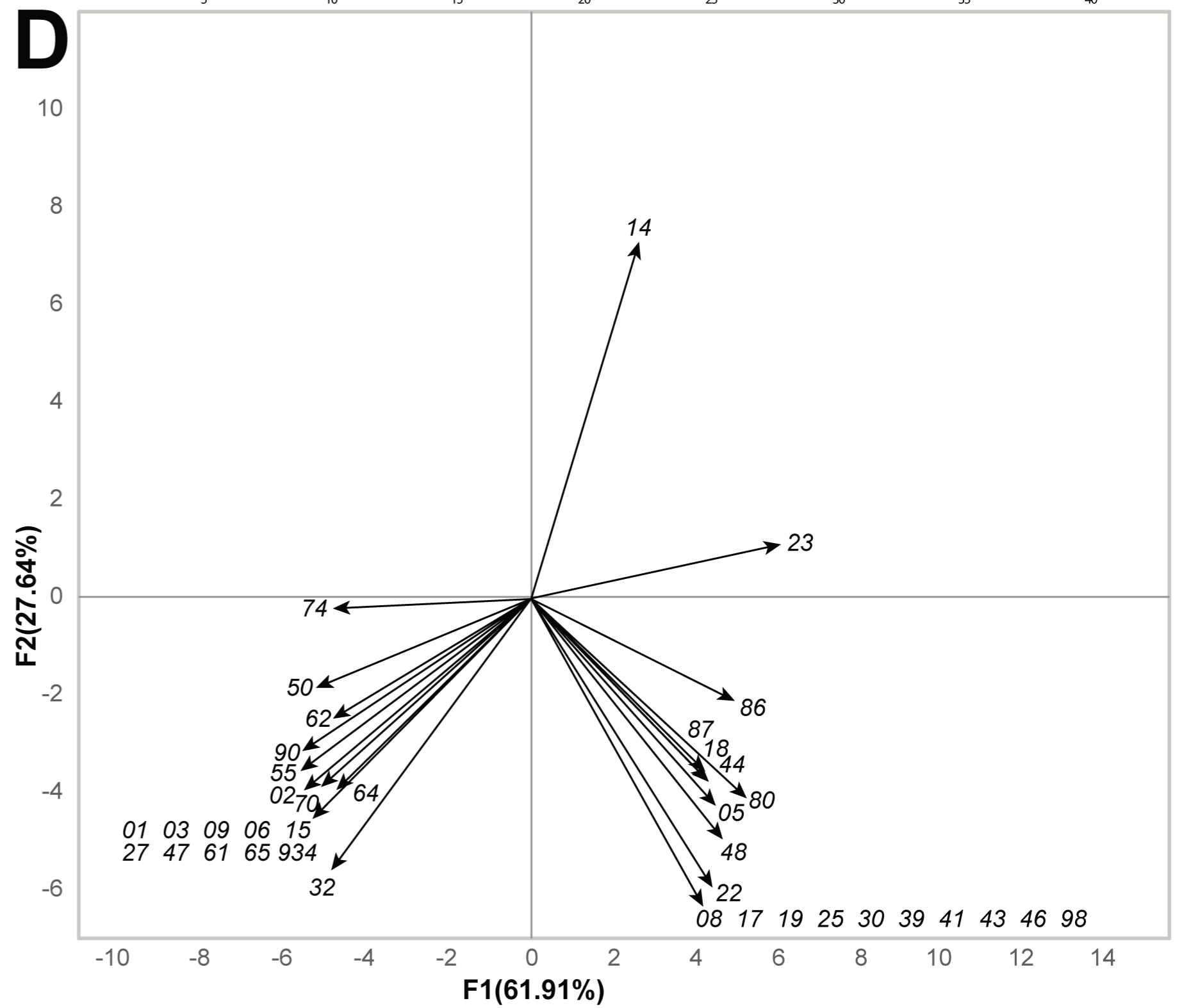
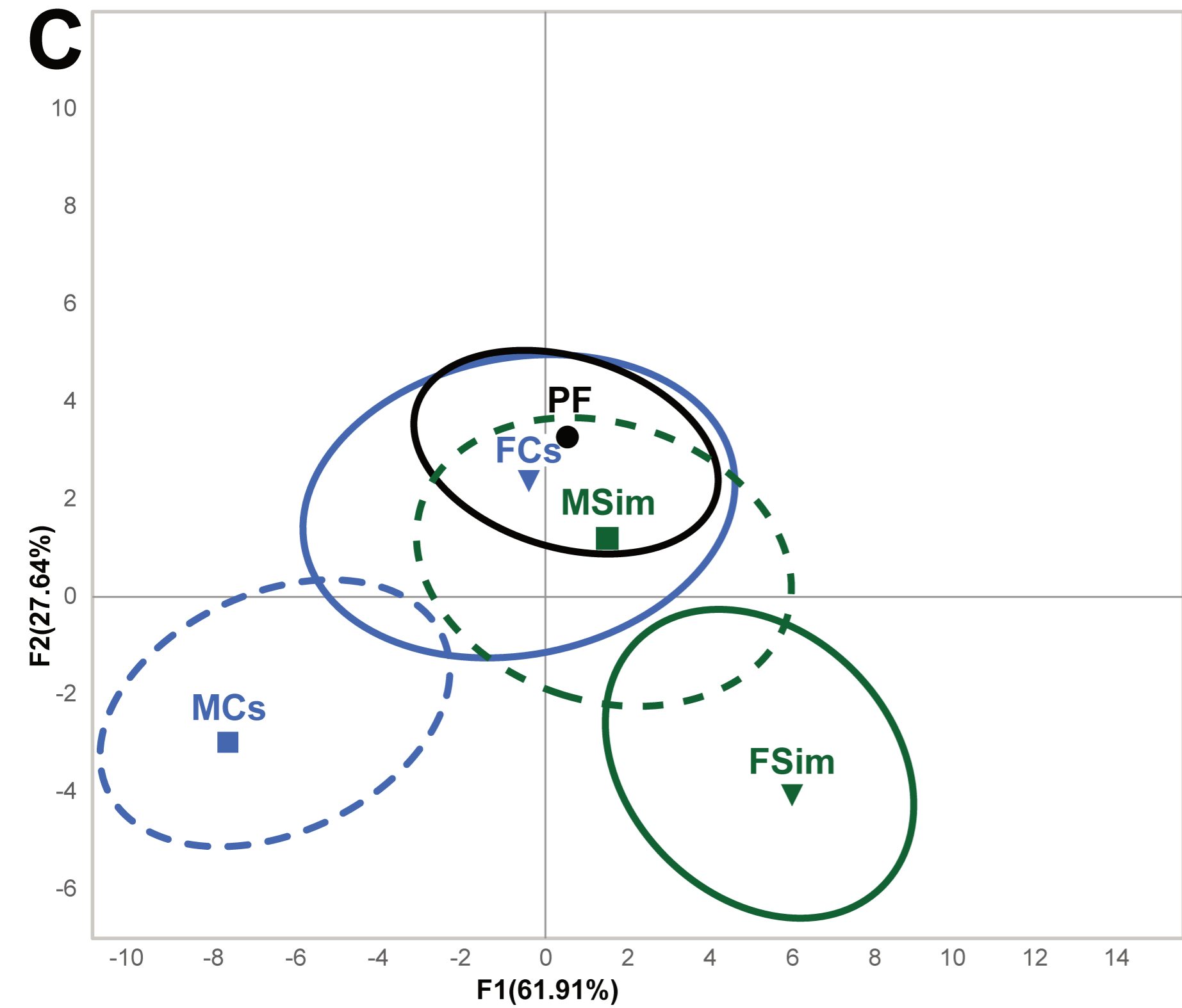
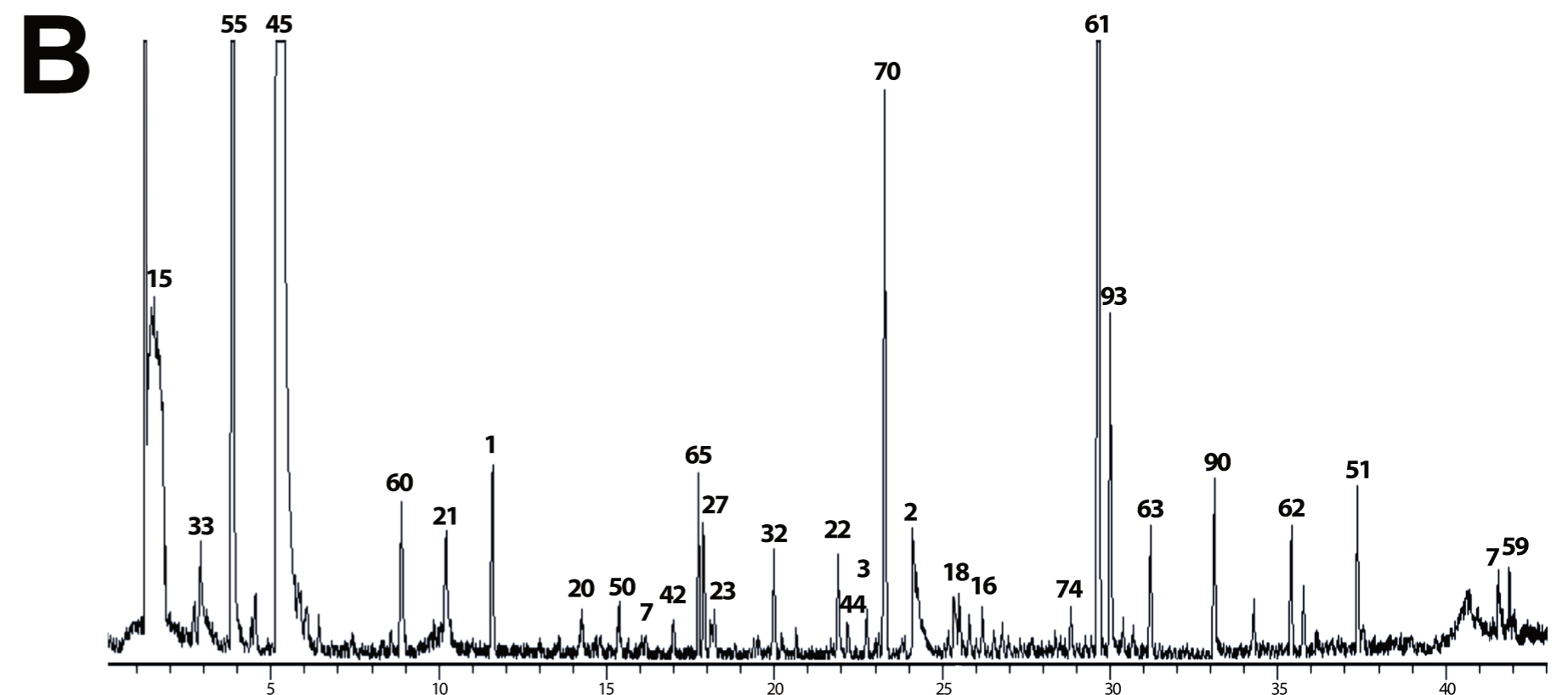
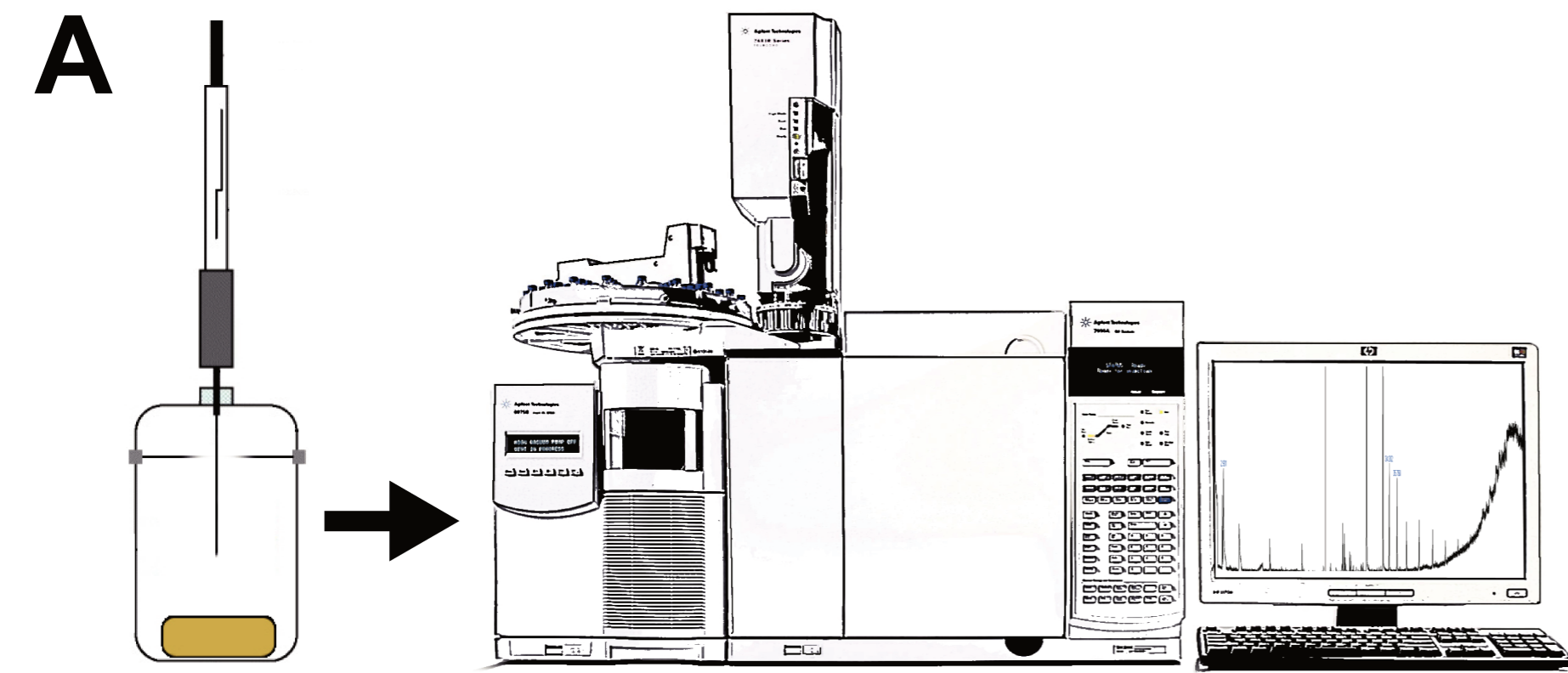
# FEMALES

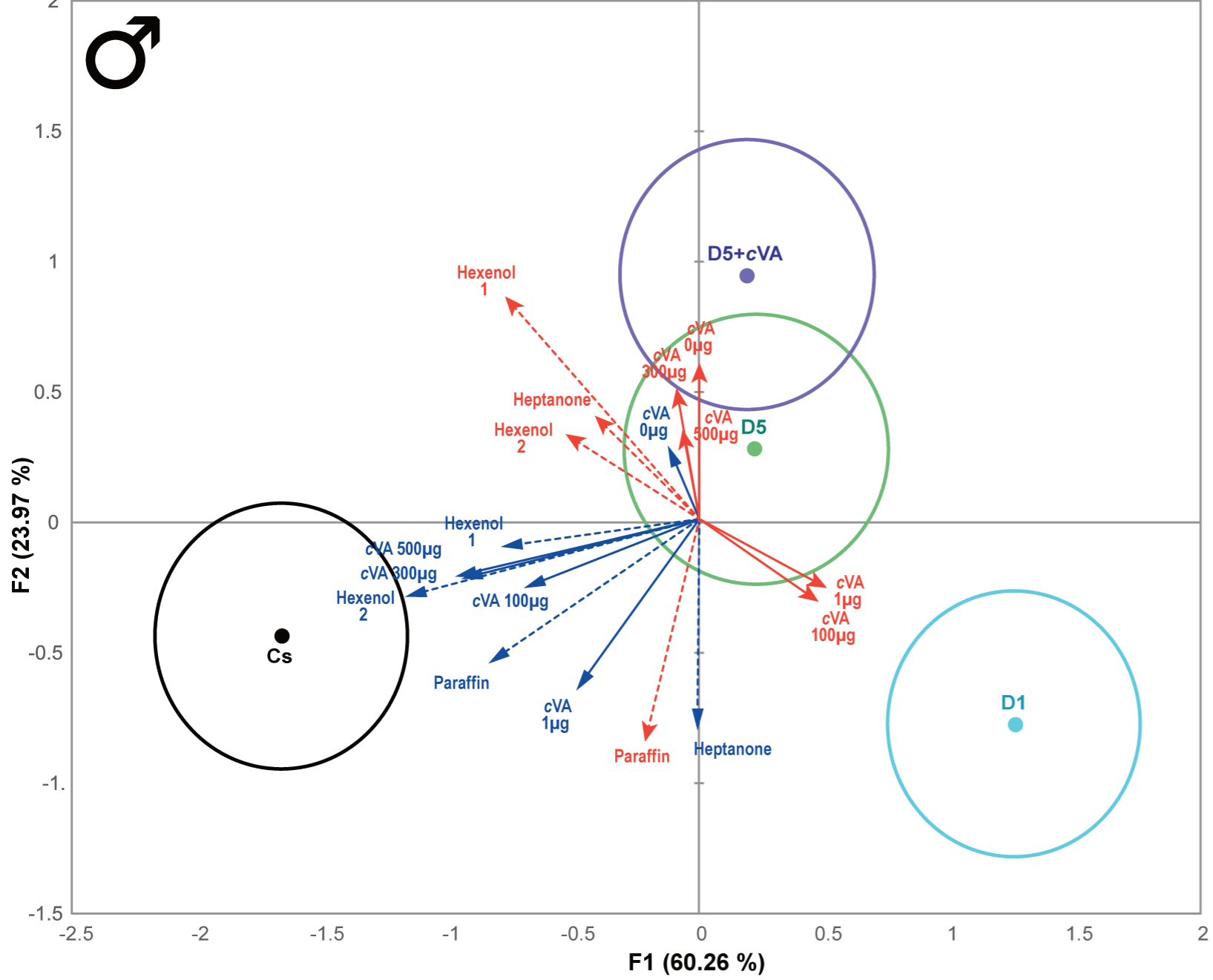
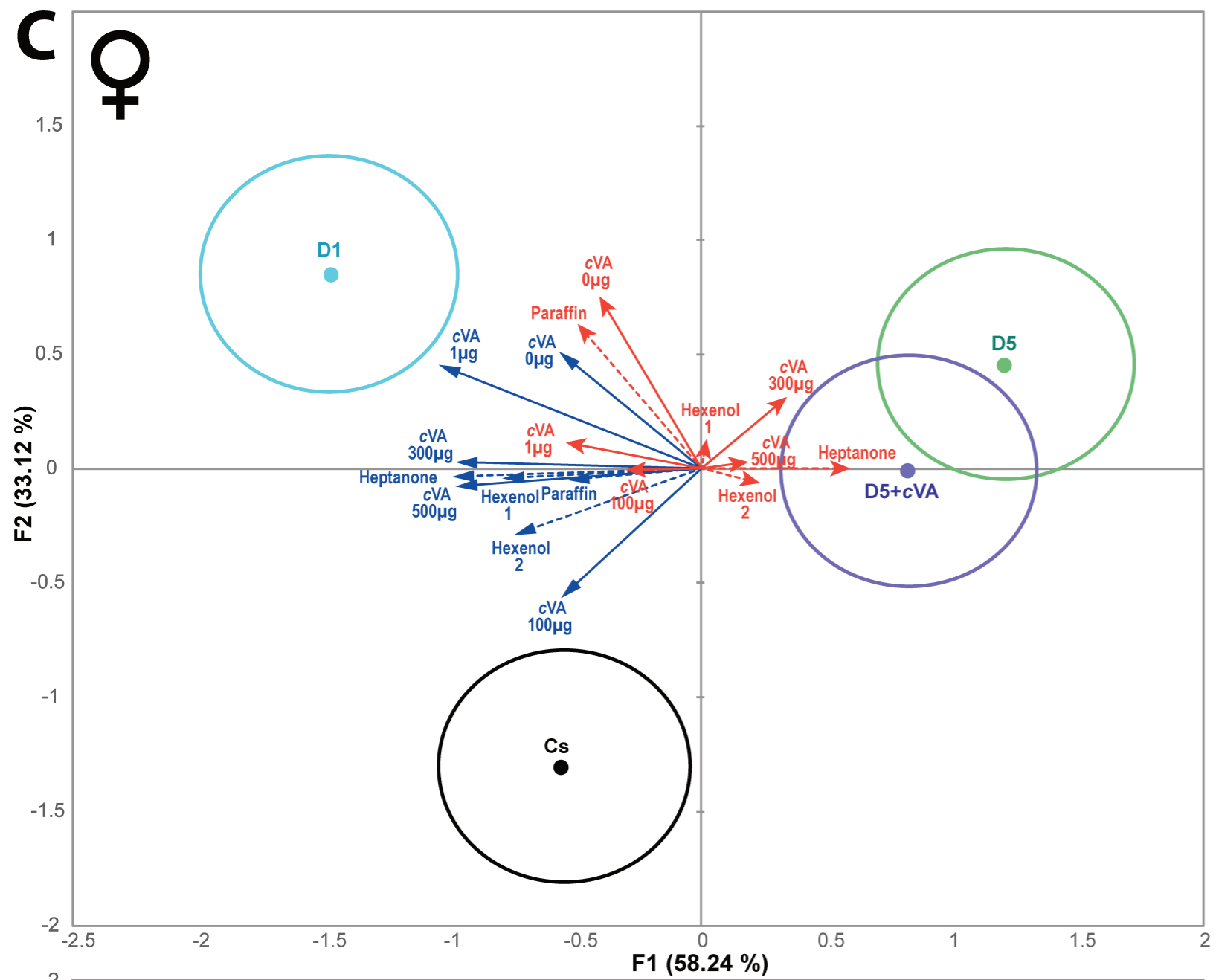
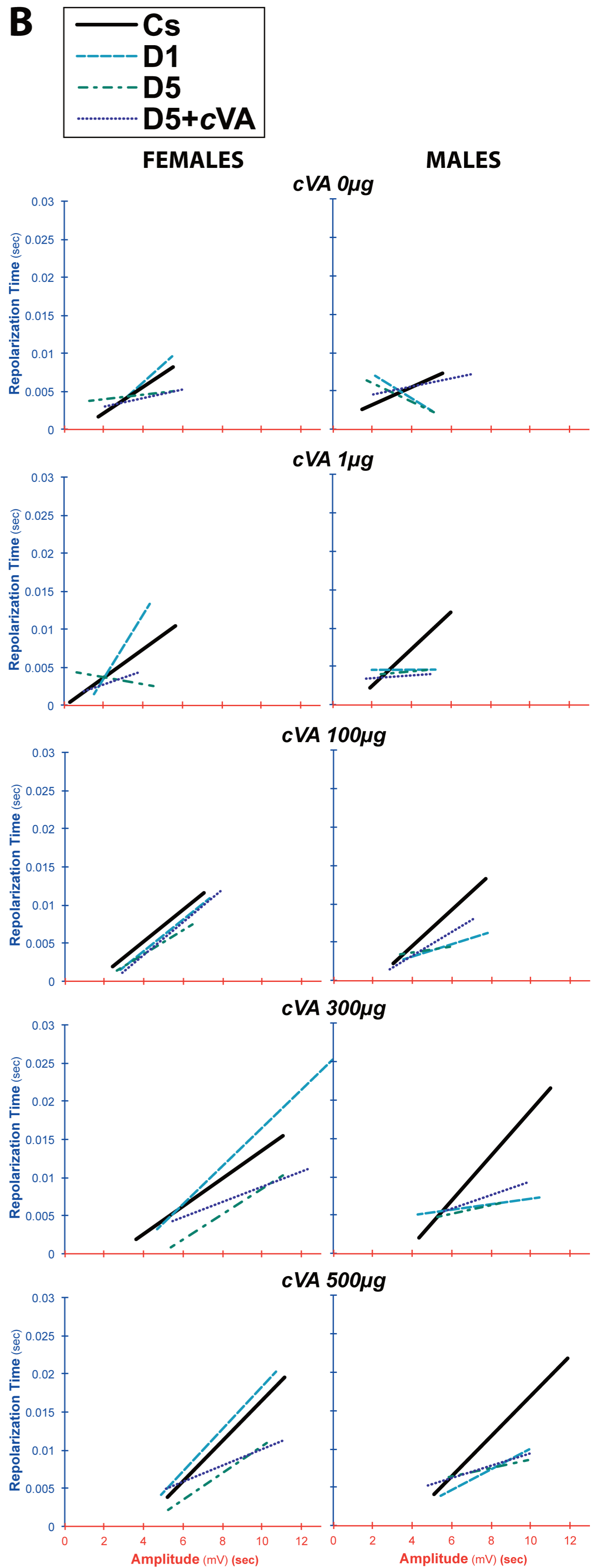
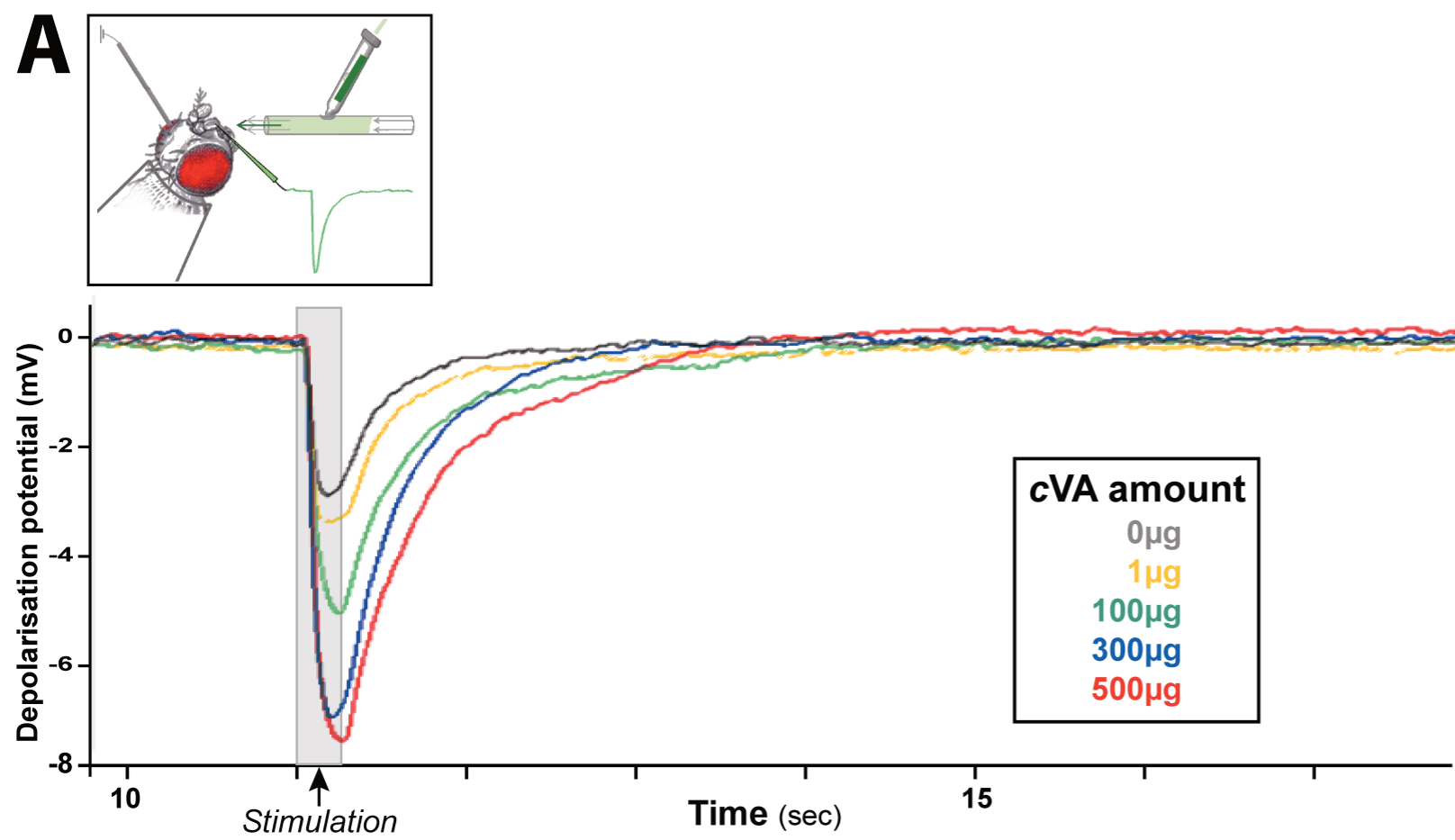


# MALES

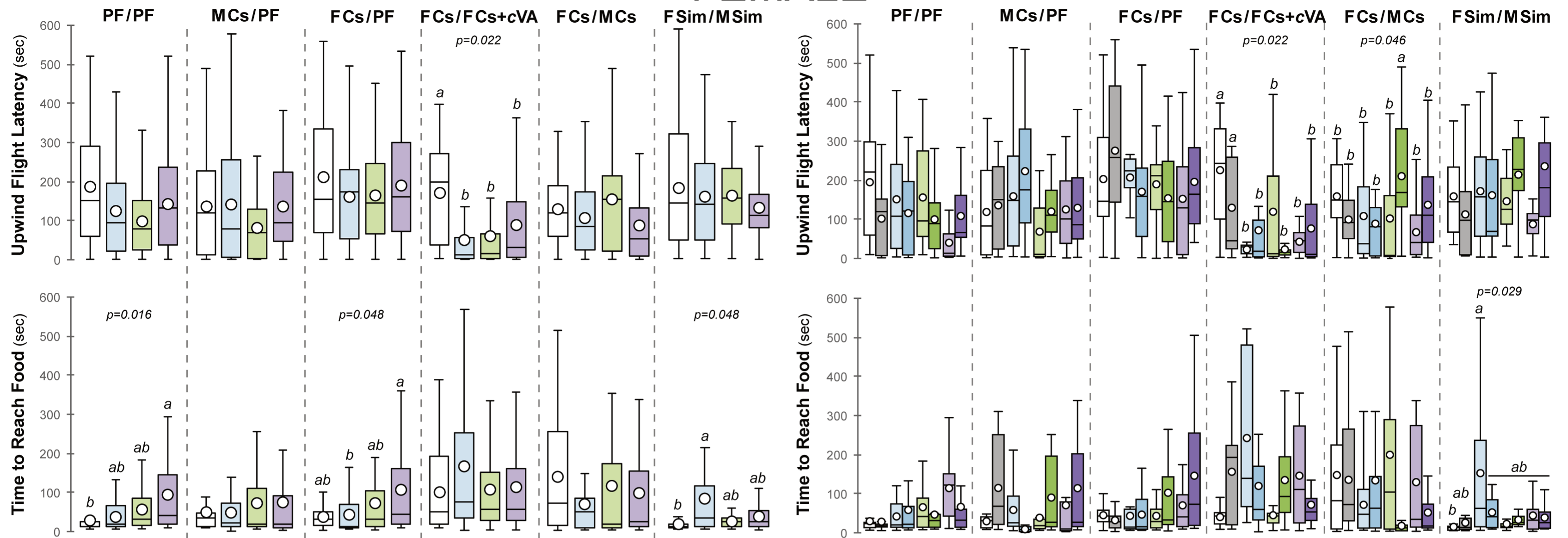




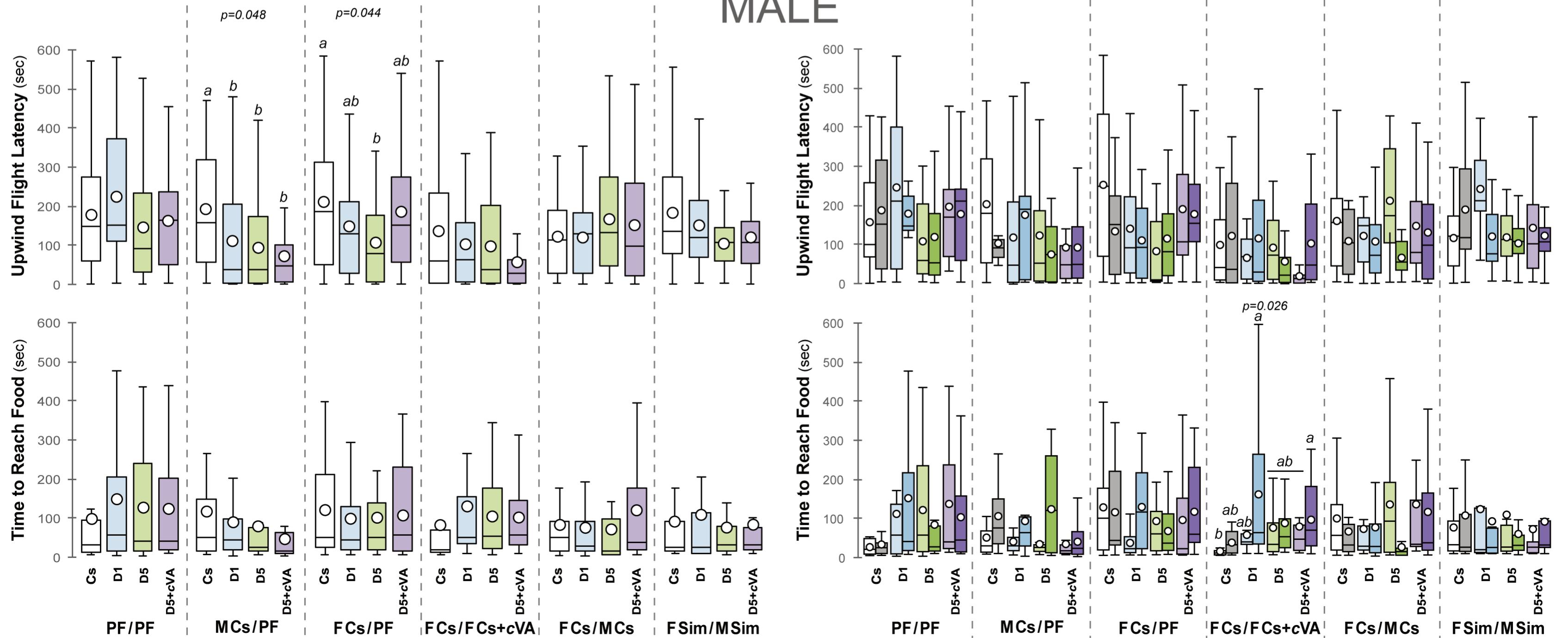


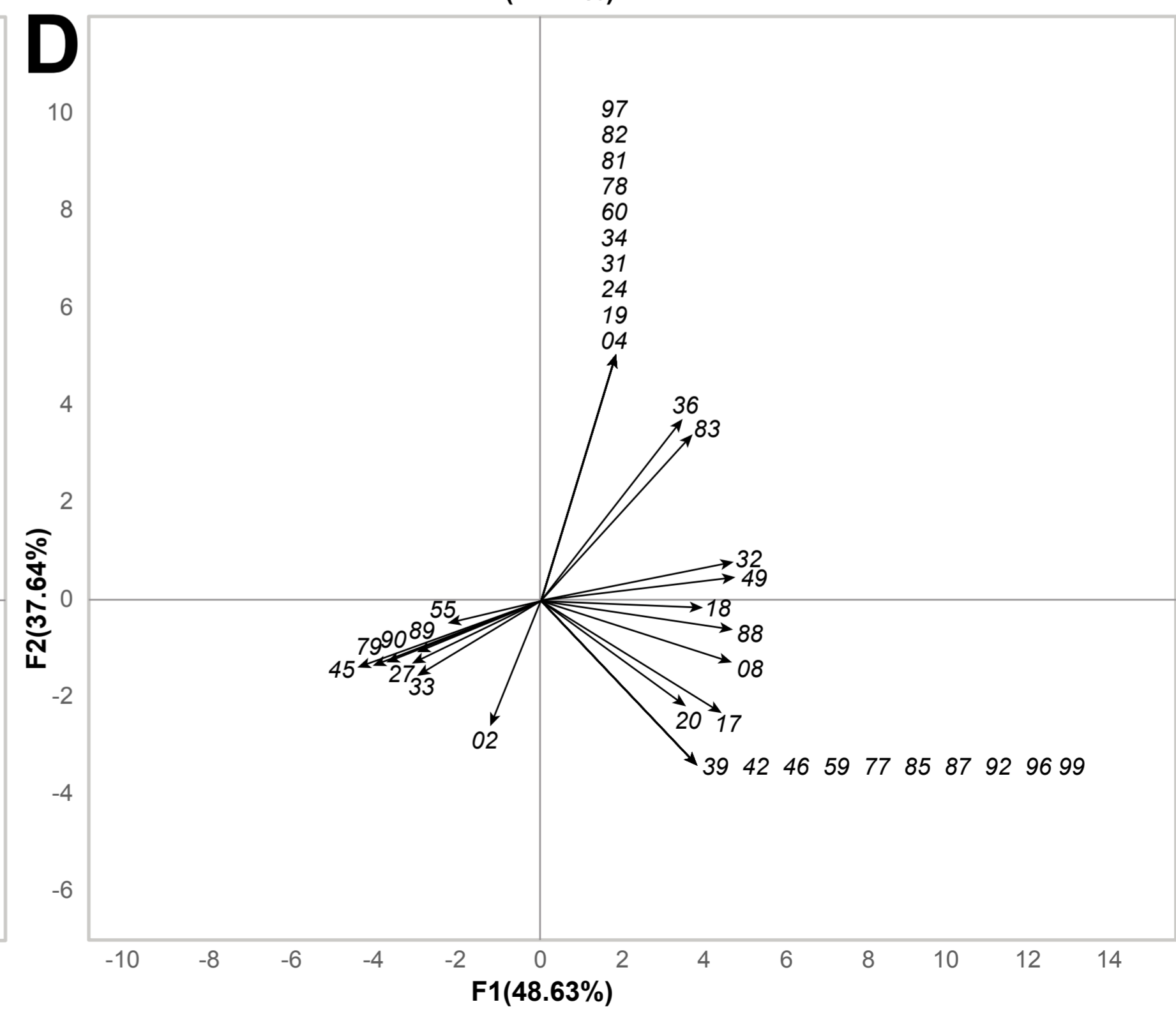
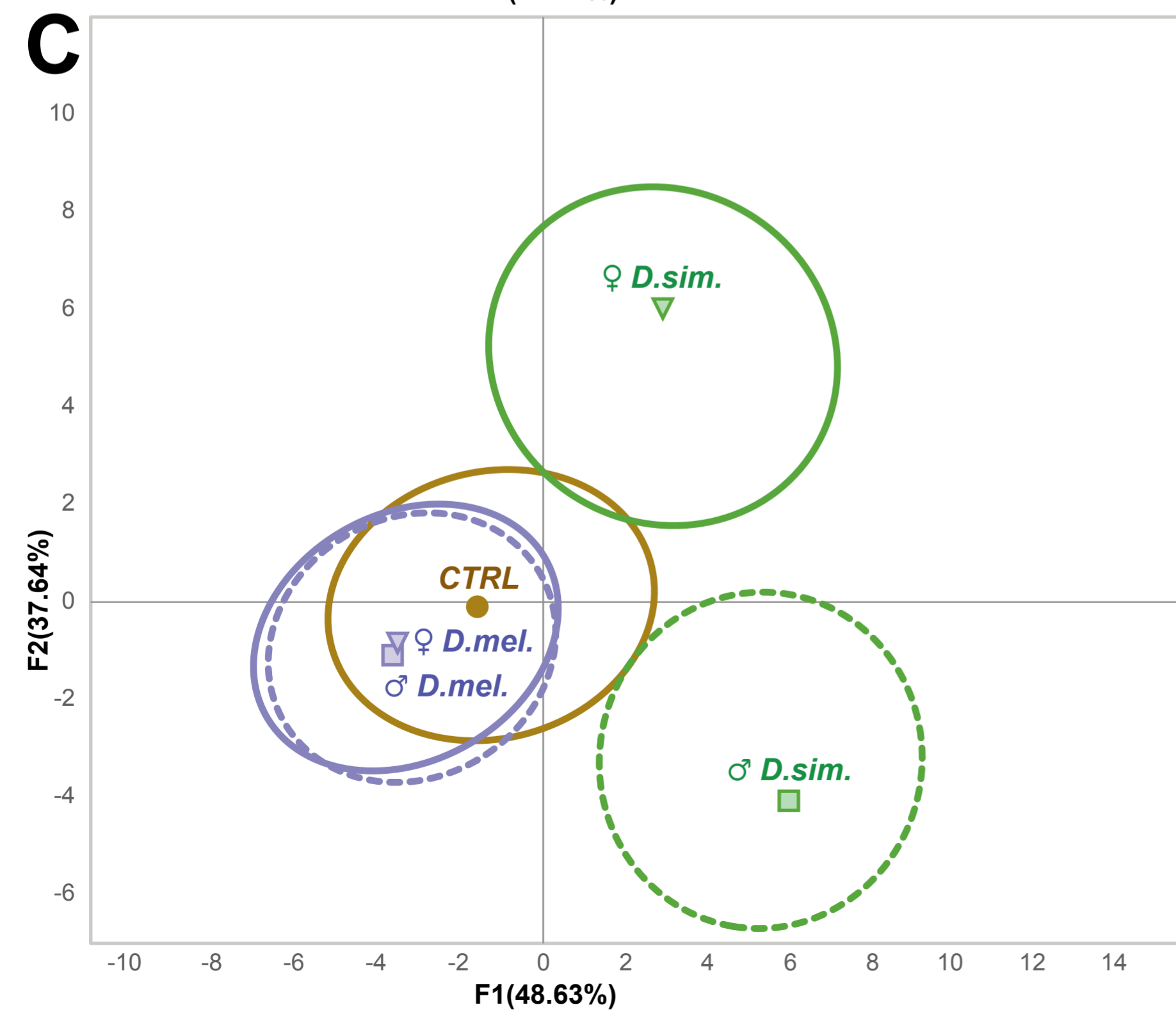
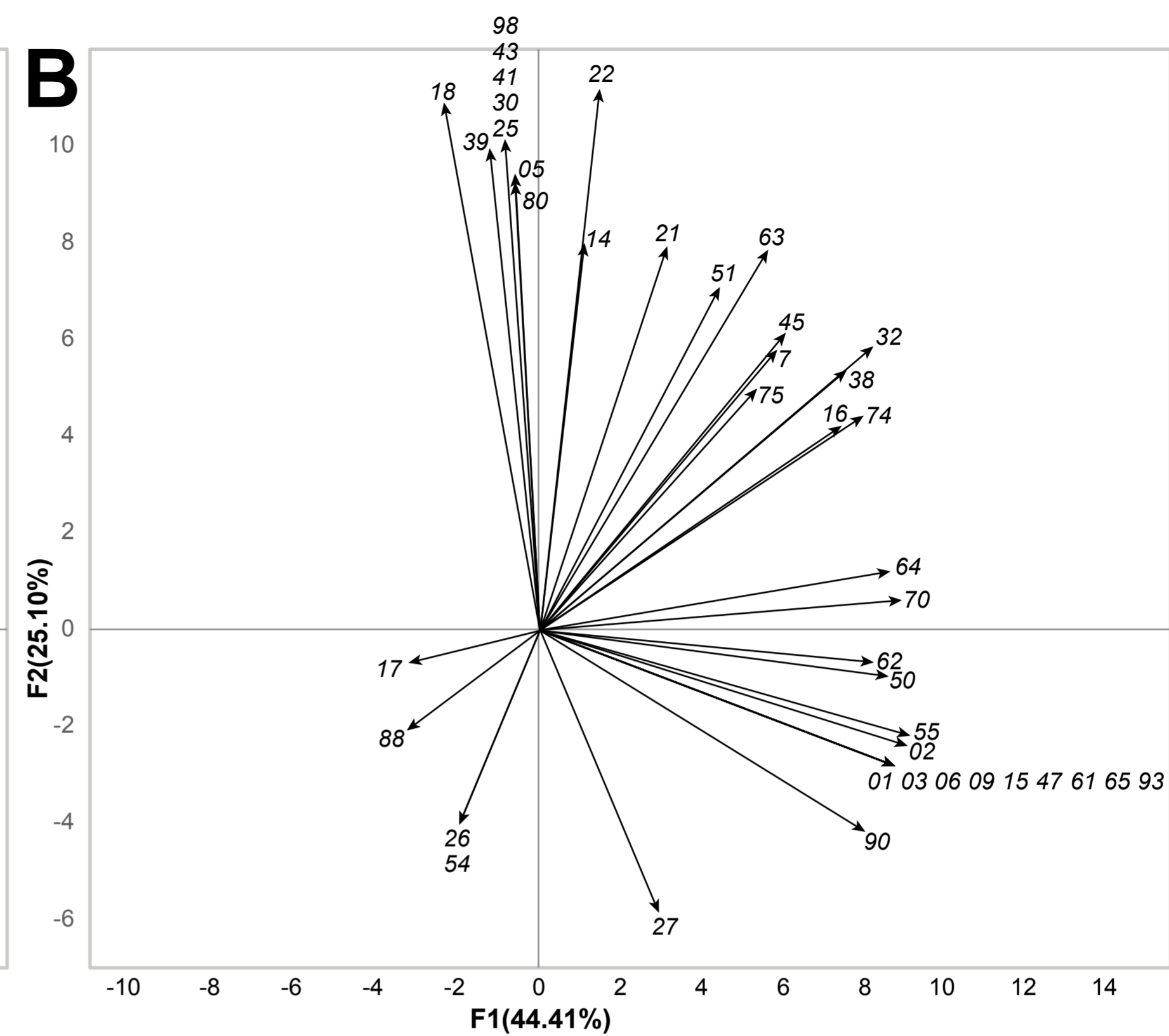
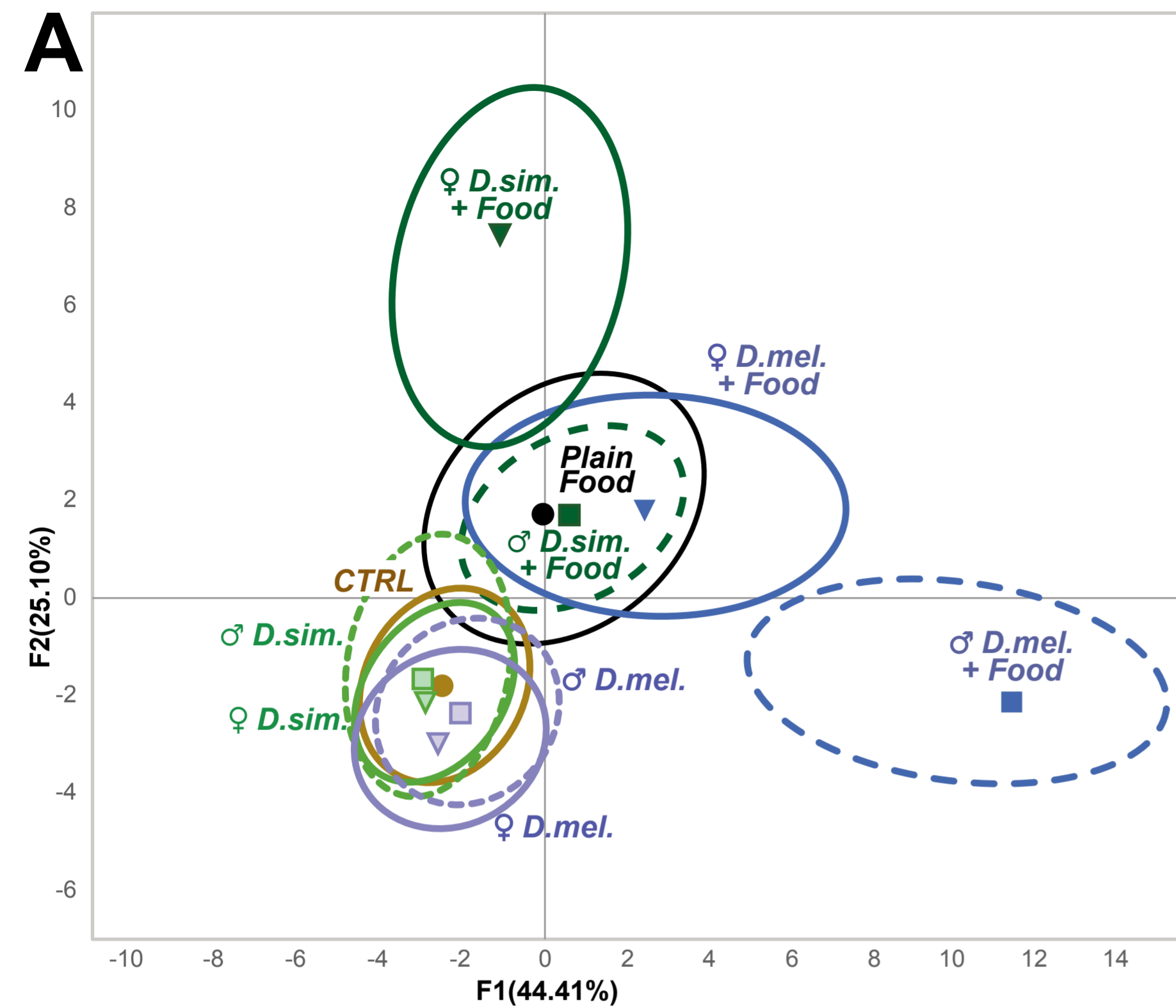


# FEMALE



# MALE



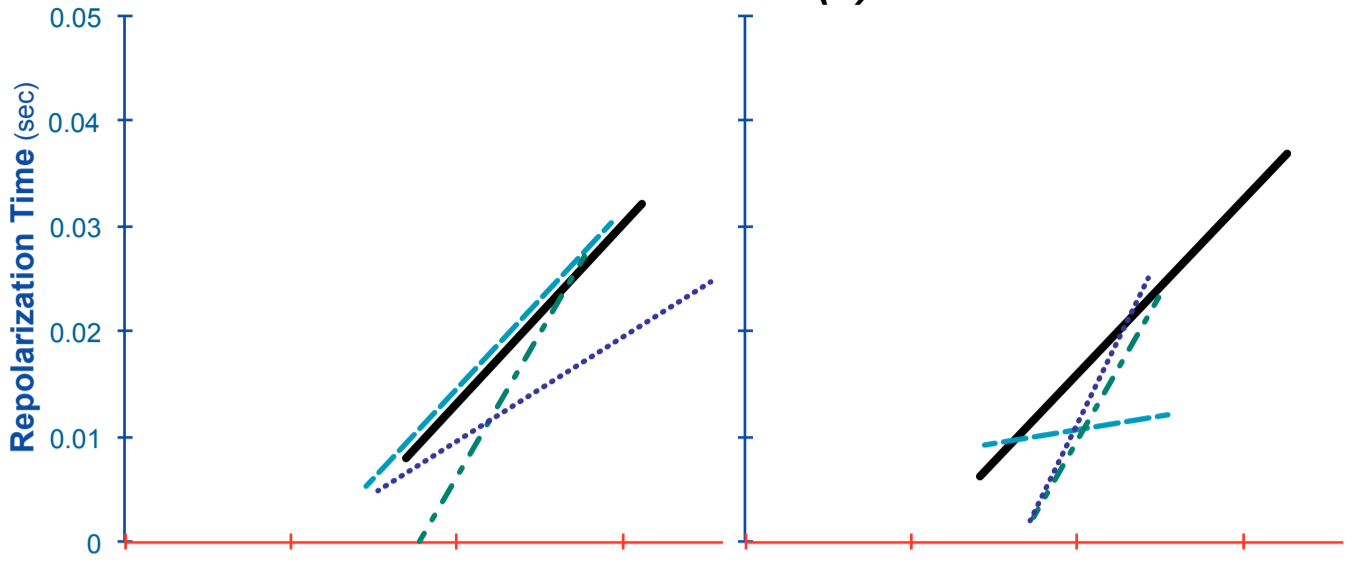


# CONTROLS

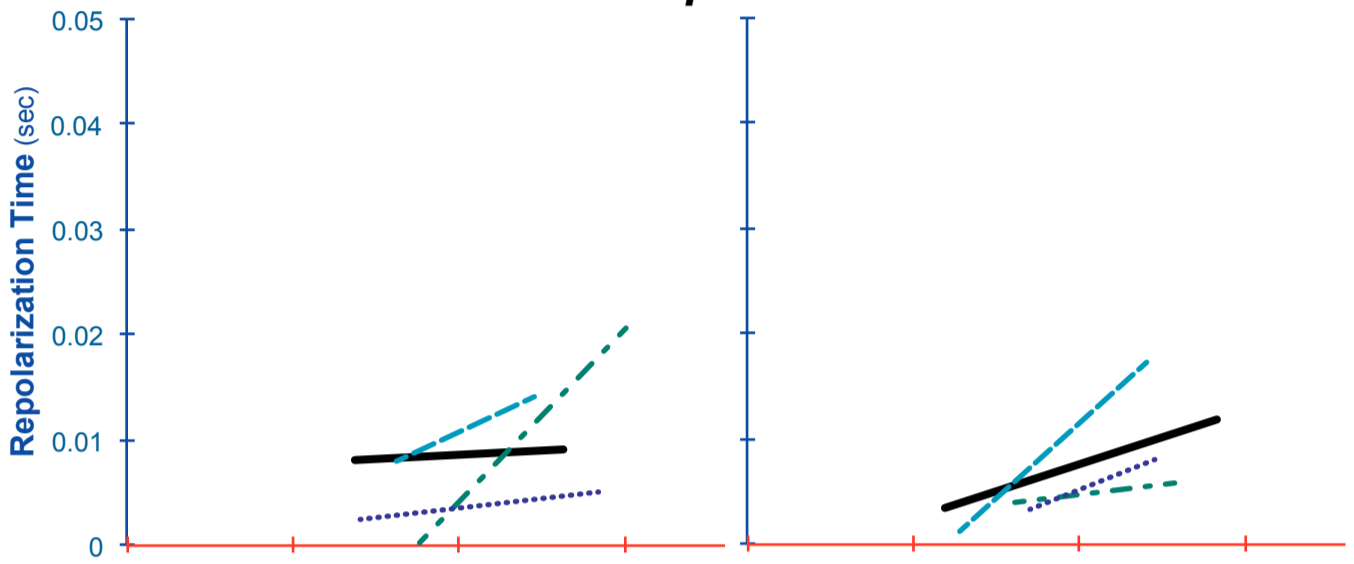
## FEMALES

## MALES

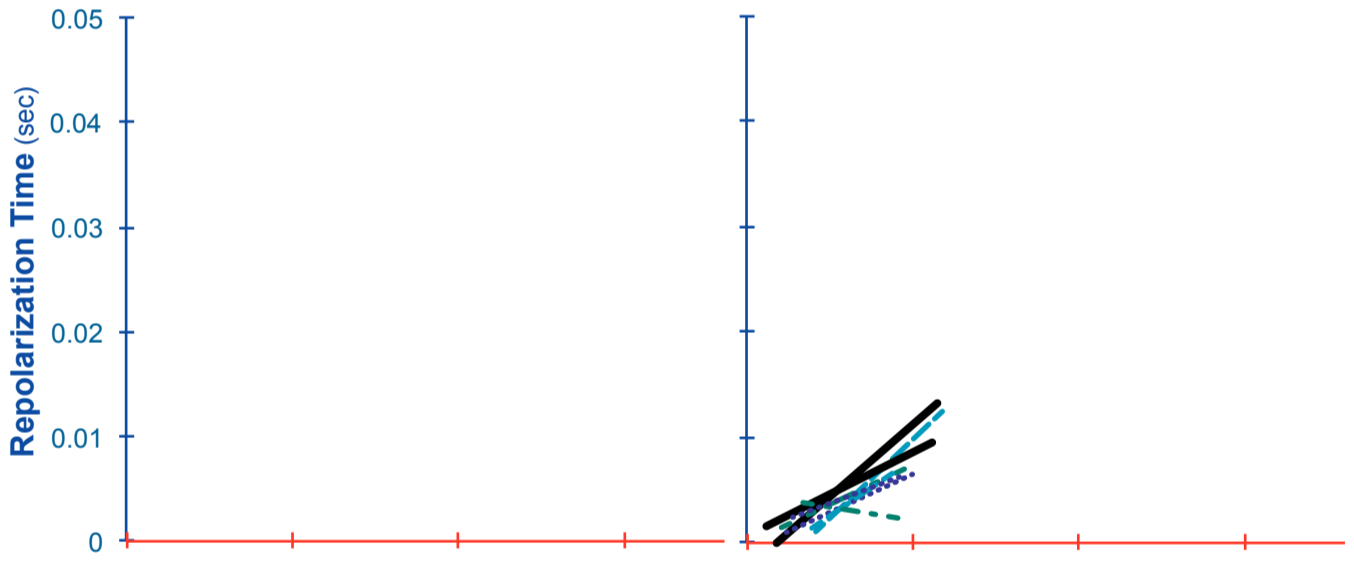
### Hexanol (1)



### Heptanone



### Paraffin Oil



### Hexanol (2)

